N° d'Ordre 16

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Besançon

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

NASEER AHMAD MALIK

Première thèse

ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT ET DU CONTENU EN FLAVONOÏDES DE LOTS DE *POLYGONUM TATARICUM* L. ET DES MODIFICATIONS INDUITES PAR DIVERS RÉGULATEURS DE CROISSANCE

Deuxième thèse

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 8 OCT 1965 devant la commission d'examen

MM. A TRONCHET — Président
C. DEVIN
M^lle^ G. LEGRAND — Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547626_0021

N° d'Ordre 16

THÈSES

présentées

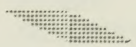
à la Faculté des Sciences de l'Université de Besançon

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

NASEER AHMAD **MALIK**



Première thèse

ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT ET DU CONTENU EN FLAVONOÏDES DE LOTS DE *POLYGONUM TATARICUM* L. ET DES MODIFICATIONS INDUITES PAR DIVERS RÉGULATEURS DE CROISSANCE

Deuxième thèse

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 1965 devant la commission d'examen

MM. A TRONCHET — Président
C. DEVIN
M^lle^ G. LEGRAND — Examinateurs

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

FACULTE DES SCIENCES

Doyen Honoraire : M. GLANGEAUD
Professeurs : MM. BAILLAUD R., DUFFIEUX, THIRY, TRILLAT, UEBERSFELD, VINCENSINI
Maître de Conférences Honoraires : M. GRANIER

DOYEN	M.	JACQUEMAIN	: Chimie Appliquée
ASSESSEUR	M.	MESNAGE	: Chronométrie
PROFESSEURS	MM.	TRONCHET	: Botanique
		CHATELET	: Mathématiques
		PERROT	: Chimie Générale
		DREYFUSS	: Géologie Minéralogie
		THEOBALD	: Paléontologie et géologie stratigraphique
		CROISOT	: Méthodes mathématiques de la Physique
		QUANTIN	: BOTANIQUE
		NAHON	: Mécanique Générale
		CHALEAT	: Mécanique Appliquée
		BERNARD	: Chimie-Physique
		RIPPLINGER	: Physiologie Animale
		RIGAL	: Calcul Numérique
		VIENOT	: Physique
	Mme	ROZIS	: Physique
	MM.	THIEBAUT	: Géologie Minéralogie
		GOMOT	: Zoologie
		PLUVINAGE	: Physique Théorique
		ARBEY	: Astronomie
PROFESSEURS ASSOCIES	MM.	DEFIX	: Mécanique Appliquée
PROFESSEURS SANS CHAIRE	MM.	POTIER	: Physique des Solides
		DEVIN	: Chimie Générale
		MOTCHANE	: Electronique
		REAL	: Zoologie
	Melle	LEGRAND	: Botanique
MAITRES DE CONFERENCES	MM.	VALLEE	: Mathématiques Appliquées
		GOUARNE	: Mathématiques
		THEOBALD J.	: Physique P.C.B- S.P.C.N.
		CERUTTI	: Chimie Appliquée
		REMOND	: Chargé d'enseignement de la maîtrise de conférences de Chronométrie
		BONNEAU	: Chargé d'Ens. Maîtrise de Conf Astro.
		GUERIN	: Chargé d'Ens. Maît. de Conf. Mathématiques

CONSEILLER ADMINISTRATIF UNIVERSITAIRE : M. LAMBERT.

HOMAGE OF GRATITUDE AND RESPECT TO MY KIND PROFESSORS

Madame et Monsieur

T R O N C H E T

A HAPPY SOUVENIR OF THEIR INFATIGABLE HELP AND GUIDANCE.

(Naseer Ahmad MALIK)

AVANT PROPOS

Le présent travail a été entièrement réalisé à l'Institut Botanique de la Faculté des Sciences de Besançon dont le Directeur, M. le Professeur TRONCHET a bien voulu m'accueillir au cours de l'année 1964 et me réserver une place parmi les chercheurs de son Laboratoire.

Je tiens à remercier tout d'abord le Gouvernement Français et Monsieur le Directeur de l'Association pour l'Organisation des Stages en France (A.S.T.E.F.) pour les bourses qu'ils m'ont accordées et qui ont rendu possible mon séjour à Besançon.

J'exprime également ma reconnaissance au Pakistan Council of Scientific & Industrial Research, qui m'a autorisé à venir travailler en France. Ma gratitude va aussi à mon Directeur, Dr S.A. WARSI, Director of the North Regional Laboratories du P.C.S.I.R. à Peshawar pour l'intérêt personnel qu'il a bien voulu me témoigner et pour ses encouragements qui m'ont été très précieux dans la poursuite et l'achèvement de ce travail.

C'est pour moi une obligation très agréable de remercier M. le Professeur A. TRONCHET Président de mon Jury pour ses directives et les facilités qu'il m'a procurées, et tout particulièrement Mme J. TRONCHET, Chargée de Recherches du C.N.R.S., qui m'a dirigé et aidé à chaque stade de ce travail et grâce à qui a pu être mise au point la rédaction française de ce mémoire de thèse. Je conserverai toujours le souvenir de cette assistance infatigable et ne saurais trop témoigner à Mme TRONCHET la profonde et respectueuse reconnaissance que j'en éprouve.

Je remercie très vivement M. le Professeur C. DEVIN et Melle G. LEGRAND, Professeur, pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu m'accorder en acceptant d'être Membres de mon Jury.

Il m'est très agréable d'exprimer mes remerciements à MM. TAVANT, Maître-Assistant et PERNEY, Assistant Agrégé, qui m'ont donné de précieuses indications pour l'emploi du spectrophotomètre et pour la mesure des mouvements, ainsi qu'à M. TABOUREAU, Contremaître du Jardin Botanique qui s'est chargé très aimablement de me fournir le matériel végétal vivant nécessaire à ces recherches.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude au Laboratoire de Botanique pour l'aide matérielle qui m'a été fournie pour la reproduction du texte et des figures. Je remercie enfin M. MARCHAND, Aide Technique Principal, pour l'aide qu'il m'a apportée dans l'exécution des graphiques de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

Page

Table des matières

AVANT-PROPOS

Introduction et limitation du sujet 1

PREMIERE PARTIE

CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT DES PLANTS TEMOINS ET DES PLANTS TRAITES 2

Conditions de culture 3

1) Croissance et développement des Plants Témoins 4

II) Croissance et développement des Plants Gibbérellines 6

III) Croissance et développement des Plants Traités par la Kinétine 12

IV) Croissance et développement des plants soumis à un traitement à la Coumarine 16

V) Ensemble des résultats concernant la Morphologie, la Croissance et le Développement de Polygonum tataricum soumis à divers traitements 20

DEUXIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS 22

I) Etude par chromatographie sur papier

Technique 23

II) Historique 29

III) RESULTATS

A : Contenu en flavonoides des Plants Témoins de Polygonum tataricum 30

1) Les flavonoides des Hypocotyles Agés 30

2) Les Flavonoides de la Région Basale de la tige Epicotylaire 36

Page

3) Les Flavonoides de la Région Apicale des Tiges 37

4) Les Flavonoides des Feuilles 37

5) Les Flavonoides des Jeunes Hypocotyles 48

B : Remarques sur les Contenus Respectifs en Flavonoides des Hypocotyles, des Tiges et des Feuilles de Plants Témoins 51

C : Effets du vieillissement sur le Contenu en Flavonoides des Hypocotyles et des Tiges des Plants Témoins 52

1) Hypocotyles 52

2) Tiges épicotylées 53

D : Discussion Générale sur le Contenu en Flavonoides des Plants Témoins 54

TROISIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS GIBBERELLINES MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT 55

A : Contenu en Flavonoides des Plants Gibberellinés de Polygonum tataricum

Modifications dûes au traitement 56

1) Les Flavonoides des Hypocotyles âgés 56

2) Les Flavonoides des Portions Agées des Tiges 57

3) Les Flavonoides des Régions Apicales des Tiges 57

4) Les Flavonoides des Feuilles des Plants GIBB 57

B : Discussion 61

QUATRIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS TRAITES PAR LA KINETINE MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT 64

A : Contenu en Flavonoides des Plants de Polygonum tataricum Traités par la Kinétine

Modifications dûes au traitement 65

1) Les Flavonoides des Hypocotyles Agés KIN 65

2) Les flavonoides des Régions Agées des Tiges KIN 74

3) Les Flavonoides des Régions Apicales des Tiges KIN 74

Page

4) Les Flavonoides des Feuilles de Plants KIN 75

B : Effets du vieillissement sur le Contenu en Flavonoides des Tiges KIN 76

C : Discussion 77

CINQUIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS TRAITES PAR LA COUMARINE MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT 80

A : Contenu en Flavonoides des Plants de Polygonum tataricum traités par la Coumarine (100 ppM)

Modifications dûes au traitement 81

1) Les Flavonoides des Hypocotyles Agés CMA 81

2) Les Flavonoides des Régions Agées des Tiges CMA 84

3) Les Flavonoides des Régions Apicales des Tiges CMA 85

4) Les Flavonoides des Feuilles des Plants CMA 88

B : Effets du vieillissement sur le contenu en Flavonoides de la Tige des Plants Traités par la Coumarine 90

C : Les Flavonoides des Plants Traités par la Coumarine à 50 ppM 91

D : Discussion 92

SIXIEME PARTIE

DISCUSSION D'ENSEMBLE SUR NOS RESULTATS CONCERNANT LE CONTENU EN FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS ET SES MODIFICATIONS A LA SUITE DES DIVERS TRAITEMENTS 93

I)

A : Résultats concernant les Flavonoides des Plants Témoins 94

B : Confrontation des Résultats concernant les divers Réajustements des Flavonoides pour les Plants soumis à différents traitements 95

II) Récapitulation et conclusions 99

BIBLIOGRAPHIE 103

INTRODUCTION ET LIMITATION DU SUJET

Le travail de recherche qui nous a été confié est l'étude des remaniements éventuels des flavonoïdes d'un Sarrasin, Polygonacée de grande culture contenant de la rutine, hétéroside de quercétine, produits par différents régulateurs de croissance.

Nous avons choisi une espèce très voisine de Polygonum fagopyrum : le Polygonum tataricum L. qui n'avait fait l'objet que de rares travaux, et pour les traitements : l'acide gibberellique, la kinétine et la coumarine qui étaient susceptibles de produire des effets dissemblables.

Nous avons constitué des séries de plants témoins et de plants traités et suivi leur développement en procédant chaque jour à des mesures de croissance.

Des effets préliminaires ont été effectués pour déterminer le moment le plus favorable du début de traitement et sa durée ainsi que la concentration optimale des solutions à utiliser.

L'étude biochimique, faite par chromatographie sur papier à partir d'extraits éthanoliques, a porté d'abord sur les flavonoïdes des sujets témoins qui n'étaient pas connus. Pour les témoins comme pour les plants traités, nous avons dû étudier séparément non seulement les feuilles et les tiges, mais pour celles-ci leur région hypocotylaire dont le contenu en flavonoïdes s'est révélé différent. De plus nous avons préparé des extraits des régions jeunes et des régions âgées des mêmes tiges (partie épicotylée) en vue d'observer les effets du vieillissement.

PREMIERE PARTIE

CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT DES PLANTS TEMOINS ET DES PLANTS TRAITES

CONDITIONS DE CULTURE

Toutes nos cultures, tant pour les séries témoins que pour les séries traitées, sont effectuées dans des salles d'expérience, en conditions uniformes. La température se maintient à environ 25°C et l'humidité atmosphérique à 75-80%.

La lumière est fournie par des batteries de tubes "Phytor" placées au-dessus des pots. Nous avons réglé la distance de la source lumineuse aux régions apicales des plants de manière à ce qu'elle se maintienne à environ 5000 lux. L'éclairement est continu (TRONCHET 160).

Les cultures sont faites dans des pots placés eux-mêmes dans des bacs contenant de l'eau qui leur assurent une humidité suffisante.

Les graines de Polygonum tataricum L. (= Fagopyrum tataricum Gaertn.) provenant du Jardin Botanique de Besançon (récolte 1964 et 1962), sont soigneusement triées, puis mises à germer dans du terreau de jardin. Deux ou trois jours après la germination, lorsque les feuilles cotylédonaires sont étalées, nous repiquons, à raison de trois à quatre plantules par pot, des sujets de même développement pour constituer des lots homogènes. Les séries témoins, dont les plants ne subissent aucun traitement , comme les séries expérimentales, comprennent chacune une cinquantaine de sujets.

I

CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT DES PLANTS TEMOINS

Dans les conditions de culture qui leur sont offertes, les plants de P. tataricum ont un développement normal, ils fleurissent vers le 25ème jour après le repiquage et ont un aspect semblable (fig. 1) aux sujets de même espèce cultivés en plein champ.

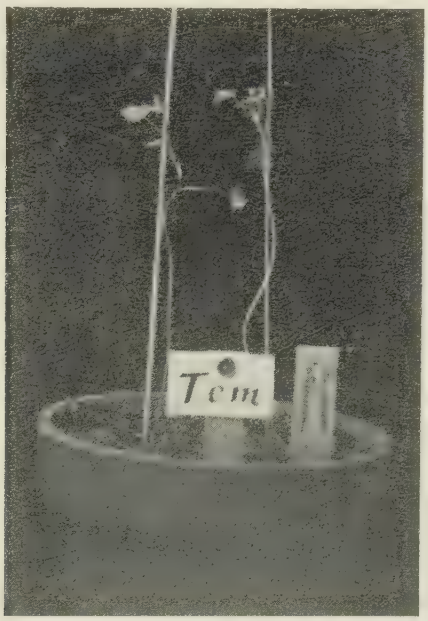


Fig. 1 : Polygonum tataricum. Aspect morphologique de plants témoins âgés de 22 jours.

Nous procédons chaque jour à la même heure, et pour 15 plants, à des mesures portant sur l'élongation des entrenoeuds successivement dégagés, sur la longueur des feuilles, et nous notons l'aspect morphologique, l'apparition de bourgeons floraux etc...

Nous les récoltons le 33ème jour - en vue de la préparation des extraits - alors qu'ils atteignent en moyenne 80 cm, avant la fin de leur croissance qui est cependant déjà assez fortement ralentie (fig. 5 courbe A).

Nous donnons dans la figure 2 un diagramme des longueurs finales des entrenoeuds successifs pour un plant témoin. Nous notons que l'hypocotyle atteint une longueur plus grande que les entrenoeuds suivants : 140 mm alors que le 4° E-N, le plus long de la tige épicotylée, n'a que 110 mm. La taille des entrenoeuds successifs augmente d'abord, puis décroît, les derniers, porteurs de rameaux florifères, restant très courts.

En vue de mettre en évidence les corrélations de croissance des divers entrenoeuds nous superposons dans la figure 3 les courbes d'accroissement journalier des E-N successifs, à partir du premier au-dessus de l'hypocotyle.

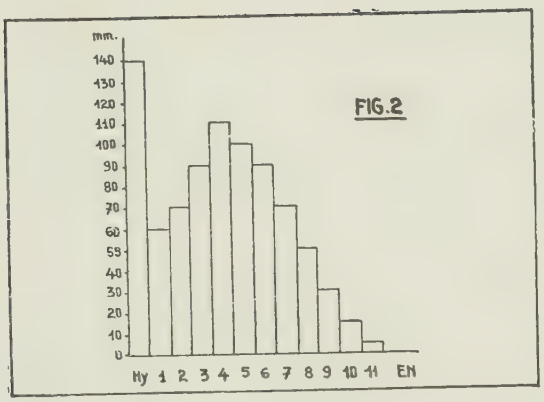


Fig. 2 : Plant témoin. Diagramme de longueurs finales des entrenoeuds; en abscisses le numéro d'ordre et en ordonnées la longueur terminale en MM.

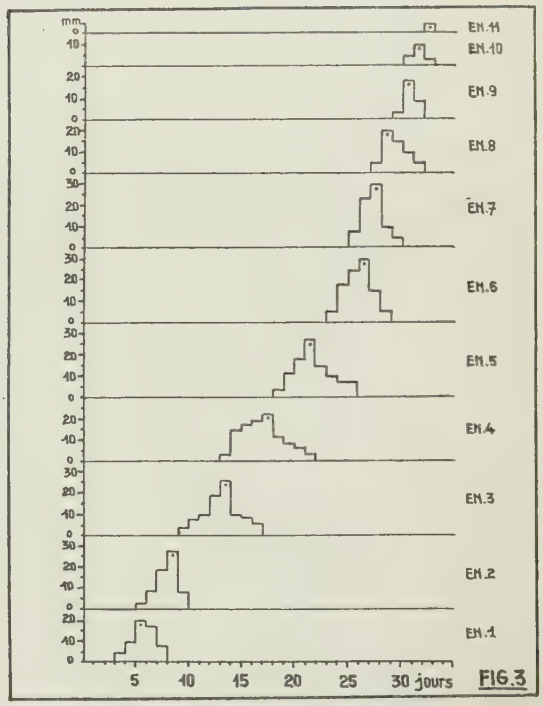


Fig. 3 : Plant témoin. Diagramme des accroissements journaliers des entrenoeuds successifs (voir texte).

L'origine de chaque courbe a pour abscisses le temps où l'entrenoeud considéré commence à croître. Le diagramme obtenu permet d'abord de constater qu'une élongation importante n'intéresse qu'un entrenoeud à la fois : la croissance d'un E-N de rang N + 1 inhibant l'allongement de celui de rang N. Ainsi, lorsque E-N 3 est atteint par la poussée de croissance le 9ème jour, E-N 2 voit son taux d'élongation diminuer brusquement de 27 à 8 mm par jour. Notons que l'intervalle de temps qui sépare, pour deux E-N successifs, leur phase de croissance maximale, devient de plus en plus court : de 4-5 jours dans la période végétative il tombe à 1 jour pendant la floraison (de E-N 6 à E-N 11).

Bien que des différences individuelles, portant notamment sur la longueur finale, apparaissent, nous avons retrouvé ces corrélations pour tous les plants témoins, et les courbes des divers sujets sont très semblables.

II

CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT DES PLANTS GIBBERELLINES

La série de plants de P. tataricum soumis à un traitement gibberellique a crû en même temps, et dans les mêmes conditions de culture que la série témoin, c'est à dire sous le même éclairement continu donnant environ 5000 lux au niveau du bourgeon apical et à la même température de 25°C.

Le traitement à l'acide gibberellique a consisté en badigeonnages soigneux au pinceau, effectués quotidiennement, d'une solution contenant 100 ppM de substance active, sur le bourgeon apical des cinquante plants de la série. Le traitement a commencé le 3ème jour après le repiquage, alors que l'hypocotyle avait presque atteint sa taille définitive, et s'est poursuivi jusqu'au 32ème jour.

HISTORIQUE

Depuis les tous premiers résultats obtenus par des chercheurs japonais (KUROSAWA 92) un très grand nombre d'espèces ont été soumises à divers traitements à la gibberelline. Nous laisserons de côté les recherches concernant les effets de l'A G sur l'abscission, sur le rythme photopériodique etc... (17, 27, 32, 33, 76, 77, 153), en n'envisageant que les réponses consistant en un allongement des feuilles et surtout des tiges, et éventuellement l'induction de mouvements révolutifs (LONA 101, 102, TRONCHET et alii 161, 162, 163, 164, 172).

Dans la plupart des cas observés, l'élongation anormale des tiges, est due plutôt à un allongement accru de chaque entrenoeud qu'à l'augmentation de leur nombre. On a noté souvent un aspect étiolé, les feuilles prenant une teinte jaunâtre.

Nous n'avons trouvé dans la bibliographie que très peu de renseignements sur la réponse de P. tataricum à un traitement gibberellique. Cependant, dans deux Notes concernant l'induction du port volubile sous l'action de l'A G, BAILLAUD et alii (8, 9) font de brèves allusions à des essais effectués sur cette espèce et qui semblent avoir été complètement négatifs. Bien qu'un Polygonum systématiquement très voisin (P. fagopyrum) soit d'après NOLL (voir 8) susceptible d'être volubile, du moins à l'obscurité, (ce qui inclinait à penser que l'A G pourrait avoir une action positive sur la circumnutation de la tige de ces plantes), ces auteurs n'ont observé ni enroulement, ni tendance au port volubile, mais seulement une forme plus grêle de la tige et une taille plus petite des feuilles qui s'étalent très tôt perpendiculairement aux entrenoeuds.

EFFETS DU TRAITEMENT PAR L'ACIDE GIBBERELLIQUE

A) ASPECTS MORPHOLOGIQUES.

Nous observons très vite pour les plants GIBB une augmentation de leur taux de croissance; dès le 10ème jour ils mesurent 12 cm de plus que les témoins, et cette avance se maintient et même s'accélère jusqu'à la fin du développement. Ils atteignent en effet 130 cm (alors que les témoins ne dépassent pas 85 cm) lorsque nous interrompons l'expérience, le 33ème jour après le repiquage, en vue de la préparation des extraits.

Nous n'observons pas de modifications morphologiques importantes (fig. 4) cependant nous notons une certaine élongation des feuilles qui gardent leur teinte normale et ne paraissent pas étiolées.

Fig. 4 : Aspect morphologique de plants gibberellinés âgés de 22 jours.

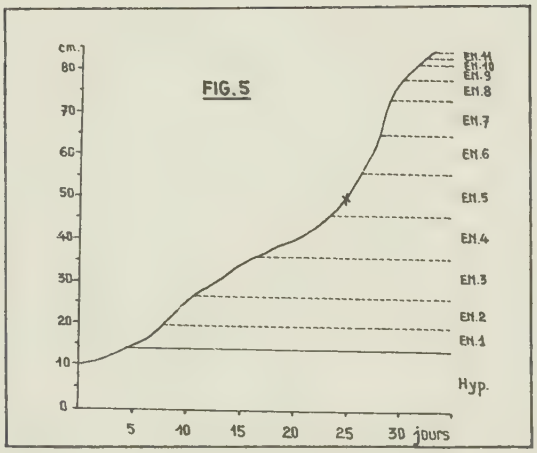
L'effet le plus marquant porte sur la longueur de la tige, celle des entrenoeuds et sur leur nombre. Les plants GIBB ont en moyenne 14-15 E-N alors que les témoins n'en forment que 10 pendant le même temps. Comme pour les sujets témoins, la tige des plants GIBB ne se ramifie qu'au sommet pour donner des rameaux florifères. La floraison se produit plus tôt (environ une semaine avant les témoins) et présente les mêmes caractères chez les uns et les autres.

A l'aide de films et de mesures, nous avons pu constater qu'à aucun moment les tiges de P. tataricum traitées à l'A G ne montrent de mouvements révolutifs. A cet égard, et dans nos conditions de culture (notamment lumière continue) le traitement à l'acide gibberellique se solde par un échec. Nous reviendrons ultérieurement sur ce point.

B) ASPECTS BIOMETRIQUES.

Nous donnons côte à côte dans la figure 5 pour un plant témoin (A) de P. tataricum et pour un plant traité GIBB (B) la courbe globale de croissance en fonction du temps, ainsi que la longueur finale des entre-noeuds.

La pente de la courbe des plants GIBB est d'emblée plus forte, le taux d'élongation plus élevé. Nous notons que les fluctuations de croissance observées pour les témoins ne se retrouvent plus chez les gibberellinés où la courbe est beaucoup plus régulière.



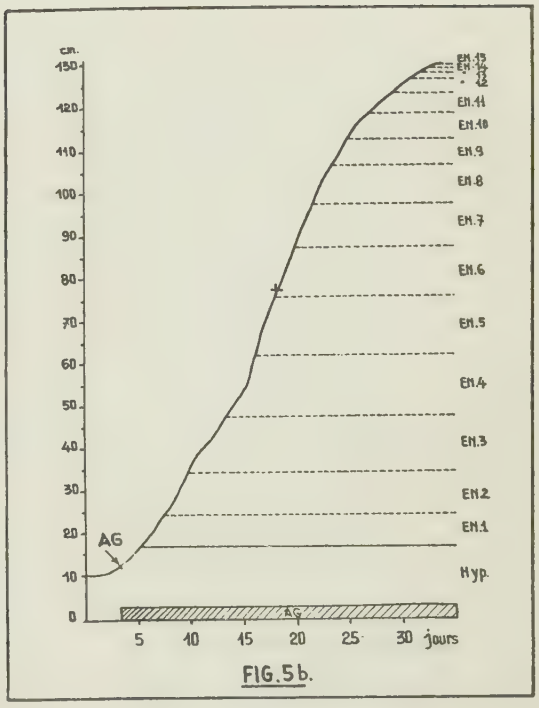


Fig. 5 : Plant témoin.

Fig. 5 b : Plant GIBB. Courbes globales de croissance en fonction du temps. En abscisses, les temps en jours; en ordonnées, les longueurs en cm. La croix X indique le début de la floraison. Les traits horizontaux en tirets séparent les divers E-N.

Les entre-noeuds des plants traités GIBE sont à la fois plus nombreux et plus longs, cependant la réponse de P. tataricum à cet égard est plus atténuée que pour d'autres espèces : Ocimum basilicum par exemple (167) où les E-N des plants gibberellinés atteignent une longueur quatre à cinq fois plus grande que ceux des témpins.

Si nous comparons la figure 6 qui donne pour un plant GIBB le diagramme des longueurs finales des E-N avec le diagramme correspondant concernant un plant TEM (fig. 2), nous observons que le schéma général n'est pas modifié : l'hypocotyle est toujours plus long, le premier entre-noeud de la tige épicotylée étant assez court et les suivants croissant régulièrement jusqu'au 4ème E-N, puis décroissant. La longueur des E-N par rapport aux témoins, quoique nettement plus élevée, n'est cependant que de l'ordre de 30 à 50%. Notons que l'hypocotyle lui-même montre un léger accroissement de longueur (14%); il a réagi très vite à l'acide gibberellique puisqu'il avait presque atteint sa taille normale au début du traitement.

Nous avons dressé (fig. 7) pour un plant GIBB pris comme exemple, le même diagramme que celui donné dans la figure 3 pour un sujet témoin.

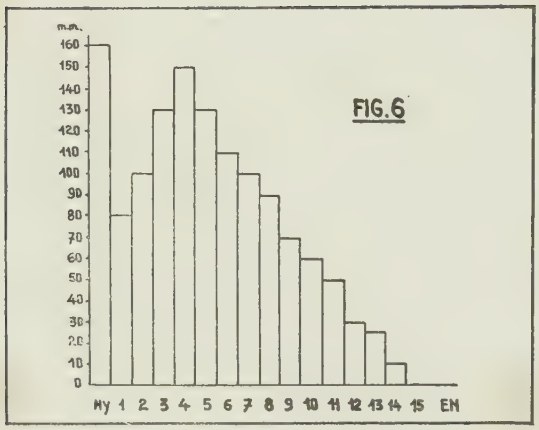


FIG.6

Fig. 6 : Plant GIBB. Diagramme de longueurs finales des entre-noeuds. En abscisses le numéro d'ordre; en ordonnées, la longueur terminale en mm.

On retrouve, chez le plant traité GIBB, les mêmes corrélations concernant la croissance de deux entre-noeuds successifs : un E-N de rang N + 1 ralentissant l'élongation de l'entre-noeud de rang N. Mais la durée de croissance de chacun est notablement augmentée par rapport à celle de son homologue du plant témoin (par exemple 11 jours au lieu de 6-8) et la poussée de croissance, à un temps donné, intéresse un bon nombre d'entre-noeuds qui croissent en même temps. Ainsi le 29 ème jour, on compte 7 E-N en croissance (du 8ème au 14ème inclus). Pour les témoins, il n'y a au plus que trois entre-noeuds qui subissent, au même moment, une élongation notable.

Ce fait, est important à considérer. Nous avons vu plus haut que le traitement à l'A G, s'il entraîne une élongation accrue, n'induit pas chez P. tataricum de mouvements révolutifs. Or, dans les cas où une espèce traitée à l'A G montre des mouvements de circumnutation (TRONCHET et alii 167) l'élongation anormale de la tige est localisée, à chaque moment, sur un très faible nombre d'E-N - voire un seul - dont le taux decroissance se trouve alors fortement augmenté.

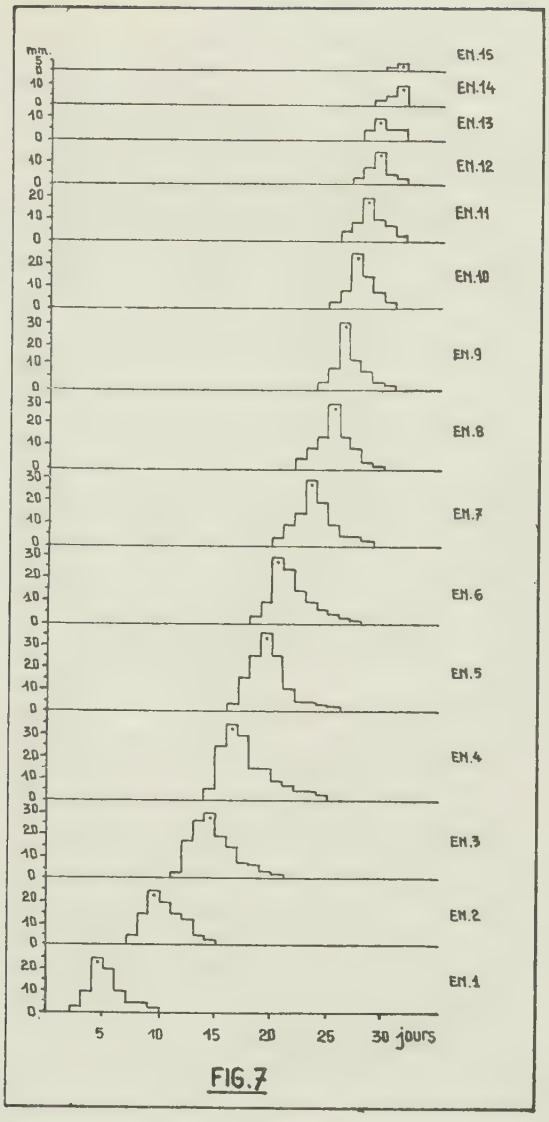


Fig. 7 : Plant GIBB (voir fig. 3).

DISCUSSION

La réponse de P. tataricum au traitement à l'acide gibberellique a été positive en ce qui concerne l'élongation qui est notablement accrue. Mais nous avons vu que le traitement ne modifie pas les corrélations de croissance des entre-noeuds successifs, l'E-N supérieur ralentit lacroissance de celui qui le précède, sans la supprimer complètement, de telle sorte que plusieurs E-N sont touchés en même temps - quoique à un degré différent - par l'onde de croissance. Ainsi, le taux journalier d'élongation globale de la tige - qui est beaucoup plus important pour les sujets GIBB que pour les témoins, est réparti sur un plus grand nombre d'entre-noeuds dont aucun, par suite, ne subit à aucun moment une poussée anormale de croissance.

La non-induction de mouvements révolutifs pour cette espèce trouve peut-être son explication dans ce fait. L'étude biochimique des modifications du contenu en flavonoïdes sera sans doute susceptible de nous fournir d'autres arguments.

III

CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT DES PLANTS TRAITES PAR LA KINETINE

Nous avons cultivé en même temps, et dans les mêmes conditions de culture que précédemment, une série témoin et deux séries traitées à la kinétine (KIN). Pour ces trois séries nous disposions de graines du Jardin Botanique récoltées en 1962. Ces semences, quoique vieillies, ont toutes germé et donné des plants d'apparence normale mais un peu plus petits que dans la série témoin précédente où nous utilisions des graines de 1964.

Le traitement a consisté en badigeonnages sur la partie apicale des sujets avec une solution de kinétine (1) soit à 50 ppM, soit à 100 ppM. Les solutions d'emploi contenant respectivement 1 et 2% d'éthanol, nous avons badigeonné les plants témoins avec de l'éthanol à 2%.

HISTORIQUE

Depuis 1955 où les biochimistes OKUMURA et alii (118) isolèrent la kinétine et en établirent la formule, bon nombre de travaux eurent pour but d'étudier les effets de cette substance sur du matériel végétal très varié : cultures de tissus ou d'organes, graines en dormance, etc... (27, 37, 39, 61, 65, 76, 77, 95, 111, 112, 114, 119, 126, 141, 147, 150, 152).

En 1957 LONA et BOCCHI (103) traitant la région apicale d'espèces telles que Perilla ocimoides, Centaurea cyanus, Triticum vulgare etc... obtiennent l'intensification de la production de rameaux axillaires en diminuant ou supprimant la dominance apicale.

D'autres recherches ont mis en évidence certains effets biochimiques : augmentation de la respiration, de la teneur en RNA (52, 53) mais le matériel utilisé consistait surtout en organes détachés de la plante ou en fragments d'organes. Cependant BAMBERGER et MEYER (10)traitant des plantules d'Amaranthus retroflexus ont observé l'augmentation des pigments.

Notre travail a pour but de mettre en évidence les effets de la kinétine aussi bien sur la croissance, la morphologie que sur le contenu en flavonoïdes de plantes entières, traitées très précocement dès le stade plantule.

EFFETS DU TRAITEMENT PAR LA KINETINE

A) ASPECTS MORPHOLOGIQUES.

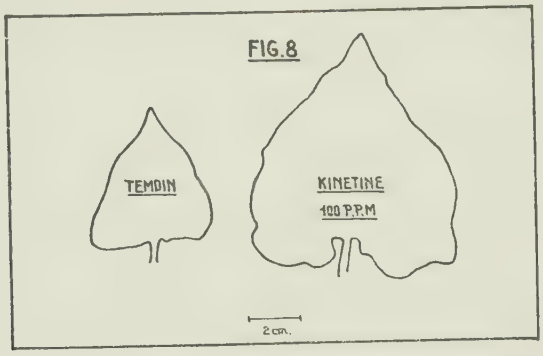
Le traitement a été appliqué très tôt, dès que la tige épicotylée atteint 30-40 mm, tous les jours à la même heure, et pendant 9 jours consécutifs, soit jusqu'au 17ème jour après le repiquage.

Les plants traités avec la kinétine à 100 ppM montrent très vite un accroissement marqué de leur taille, ceux avec la solution à 50 ppM restent assez semblables aux témoins jusqu'au 20ème jour. La floraison commence le 26ème pour les deux séries KIN et le 31ème pour les témoins.

---

(1) Nutritional Biochemical Supplies U.S.A.

Au moment de la récolte, soit le 34ème jour, les trois séries sont en pleine floraison et les plants traités KIN sont encore en période de croissance. Les plants des deux séries KIN atteignent à peu près la même taille, qui est notablement plus élevée que celle des témoins : 85 cm au lieu de 60. Ils sont plus robustes, leurs tiges sont beaucoup plus épaisses et leurs feuilles plus vertes et surtout plus amples. Nous donnons dans la figure 8 un schéma qui permet de comparer deux feuilles de même rang d'un plant TEM et d'un plant traité par la kinétine à 100 ppM. On peut noter également une légère augmentation de la ramification (rameaux florifères).



à gauche

Fig. 8 : P. tataricum : feuille d'un plant TEM (4° E-N); à droite : feuille de même rang d'un plant KIN (100 ppM).

Mais le fait le plus frappant est la formation, sur toute la longueur des entre-noeuds inférieurs de nombreuses racines adventives qui tendent à s'enfoncer dans la terre des pots (voir figure 9).

Ces racines, dégagées tardivement donnent aux plants traités KIN un aspect très anormal. Leur croissance que nous n'avons pas mesurée, a été très rapide puisqu'en quelques jours elles atteignent une trentaine de centimètres. Cependant, on peut observer chez les témoins des formations analogues, mais dans ce cas les racines adventives restent très courtes (20mm au plus), très peu nombreuses et localisées uniquement sur l'hypocotyle alors que pour les plants traités KIN l'hypocotyle et les 2 E-N inférieurs sont pratiquement recouverts d'un chevelu de longues racines.

Ainsi le traitement par la kinétine, pour les deux concentrations utilisée, a entrainé une meilleure croissance des plants de P. tataricum qui deviennent non seulement plus hauts, mais aussi plus robustes. Dans nos conditions de culture, nous n'obtenons pas de ramifications nouvelles de la tige principale - comme on aurait pu s'y attendre, la kinétine passant pour supprimer la dominance apicale - les seuls rameaux formés (plus robustes) sont florifères et se dégagent, au cours de la floraison, au sommet de la plante.

La formation d'un très grand nombre de racines adventives se produit également pendant la période de floraison.

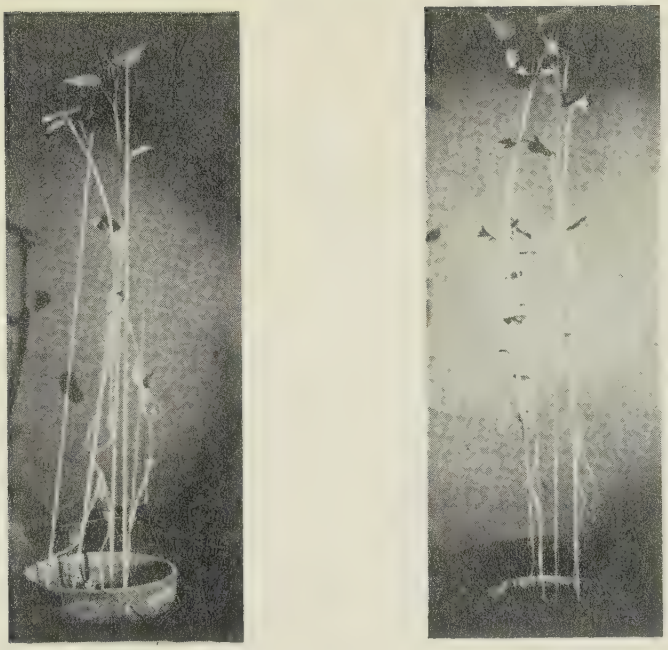


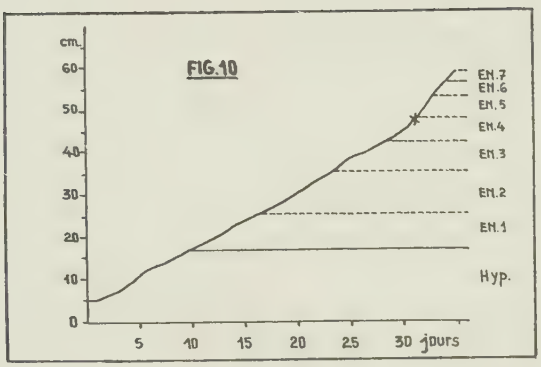
Fig. 9 : Plants de P. tataricum âgés de 20 jours. A gauche : plant TEM; à droite : plant KIN (100 ppM). Noter la formation de racines adventives.

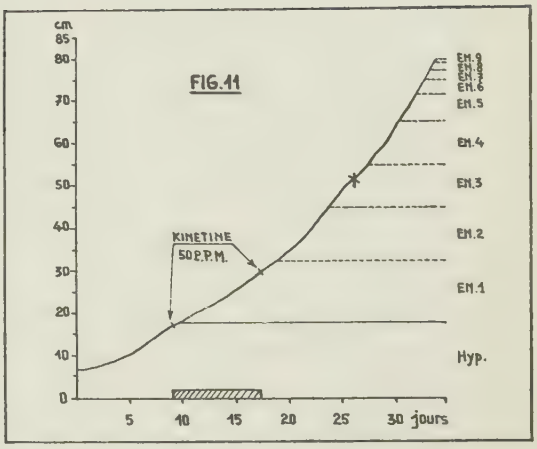
La légère tendance des plants TEM à former de rares et courtes racines adventives a donc été fortement exagérée par les traitements à la kinétine. Ce fait nous semble difficile à interpréter d'un point de vue physiologique. Nous pouvons cependant le rapprocher des résultats, observés sur des cultures de tissus ou d'organes (feuilles de Marsilea Drummondi) où la kinétine semble avoir un effet favorable sur la rhizogénèse (3).

B) ASPECTS BIOMETRIQUES.

Nous donnons dans les figures 10, 11 et 12 pour un plant TEM et deux plants soumis à un traitement par la kinétine à 50 et à 100 ppM, respectivement, la courbe de croissance globale en fonction du temps et les longueurs finales des entre-noeuds.

Pour les plants traités à 50 ppM l'effet ne débute que vers la fin du traitement alors que pour ceux à 100 ppM il est très précoce. Pour ces deux séries la pente devient très élevée et les courbes sont plus régulières que pour les témoins. Le nombre des E-N formés pendant le même temps est également un peu accru (9-10 au lieu de 7 en moyenne). La taille plus élevée des plants traités est due également à l'accroissement de longueur des différents entre-noeuds.





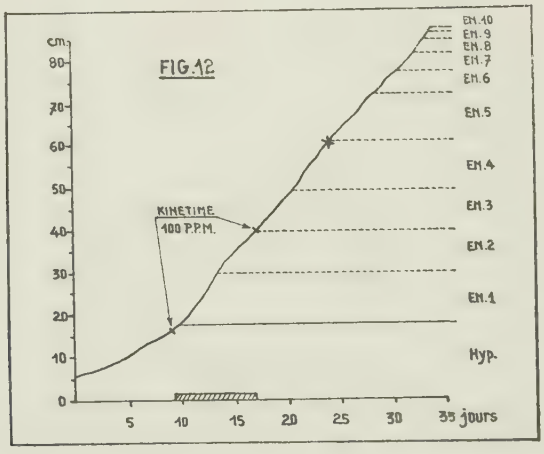


Fig. 10 : Courbe de croissance en fonction du temps du repiquage à la récolte (graines de 1962); plant TEM.

Fig. 11 : Plant KIN (50 ppM).
Fig. 12 : Plant KIN (100 ppM).

DISCUSSION.

En résumé, les traitements par la kinétine, dans nos conditions de culture, augmentent dans une forte mesure la vigueur des sujets qui, plus robustes, montrent une croissance plus rapide, forment des feuilles plus larges et plus vertes, et fleurissent abondamment une semaine avant les témoins.

Un autre effet remarquable est la formation de très nombreuses racines adventives sur les entre-noeuds inférieurs. Nous nous proposons d'étudier plus loin les modifications concernant les flavonoïdes.

IV

CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT DES PLANTS SOUMIS A UN TRAITEMENT PAR LA COUMARINE

Pour ces essais, nous disposions de trois séries de 50 sujets de même âge et de même développement, provenant de semis de graines de 1962 : une série servant de contrôle, une traitée avec une solution de coumarine à 50 ppM et une autre avec une solution à 100 ppM. Les plants sont cultivés, comme précédemment, dans nos salles d'expériences à température constante et en lumière blanche continue.

La coumarine (1) est appliquée par badigeonnages au pinceau sur le bourgeon apical de jeunes plants. Après des essais préliminaires en vue de déterminer le moment optimal de début de traitement, nous ne commençons à appliquer la coumarine que lorsque les plants, 15 jours après leur repiquage, atteignent 23-25 cm. A ce stade, les sujets, déjà robustes, ont formé l'hypocotyle et le premier entre-noeud,et sont en mesure de supporter les effets inhibiteurs de la coumarine. Si le traitement est appliqué plus tôt les plantules périssent.

Le traitement est poursuivi pendant 7 jours.

HISTORIQUE.

L'action de la coumarine sur la germination est connue depuis 1914 (SIGMUND 146) et de nombreuses recherches (EVENARI et alii 42, 43) ont permis de préciser son pouvoir inhibiteur et celui de ses dérivés. D'autres travaux (29, 30) ont montré qu'elle agit, également en provoquant des perturbations, sur les mitoses. La coumarine est donc considérée comme un inhibiteur puissant (HEMBERG 64 et 88, 97, 98, 99, 105, 125, 159), agissant sur la croissance de divers organes (210, 6, 157, 125). Dans certains cas où elle semble permettre une élongation normale, chez les plantules de Cuscuta par exemple (J. TRONCHET 193) elle supprime les mouvements révolutifs et induit la formation de tumeurs.

EFFETS DU TRAITEMENT PAR LA COUMARINE

A) ASPECTS MORPHOLOGIQUES.

La série de plants traités avec la solution faible de coumarine (50 ppM) ne montre apparemment que d'assez légères différences avec les témoins : croissance un peu ralentie, floraison moins abondante.

En revanche les sujets soumis au traitement par la coumarine à 100 ppM subissent presque immédiatement un ralentissement considérable de leur élongation - ils ne croissent que de 10 cm après le début du traitement - et ne fleurissent pas.

Dans la figure 13 où l'on peut comparer les sujets traités avec les sujets de même âge, les différences apparaissent très importantes : leur taille très réduite et leurs E-N courts leur donnent en effet un aspect nettement anormal. Les feuilles sont elles-mêmes profondément modifiées : de dimensions beaucoup plus faibles, elles ont les bords repliés en dessous ce qui accroît l'apparence maladive des plants.

---

(1) Eastman Organic Chemicals N.Y. U.S.A.

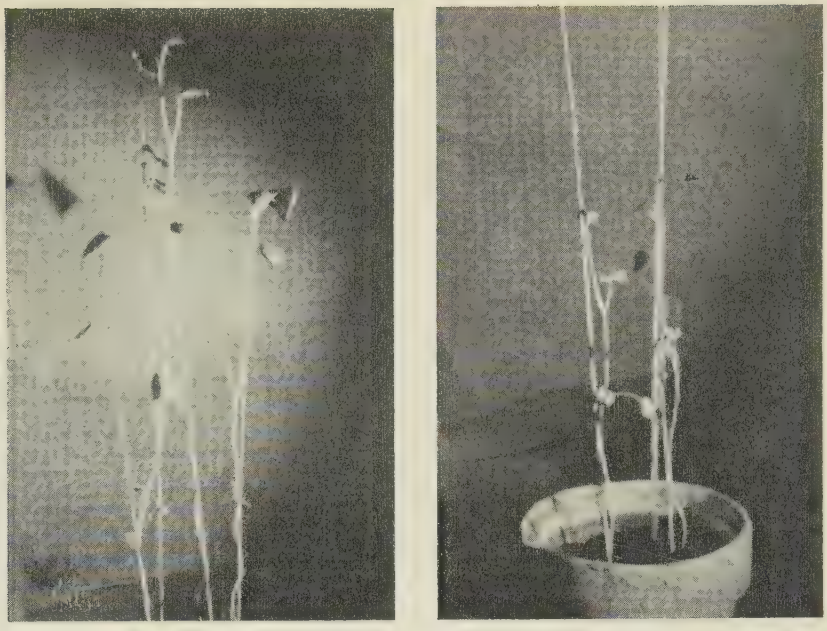


Fig. 13 : P. tataricum. Plants âgés de 20 jours. A gauche plants témoins; à droite plants traités par la coumarine 100 ppM.

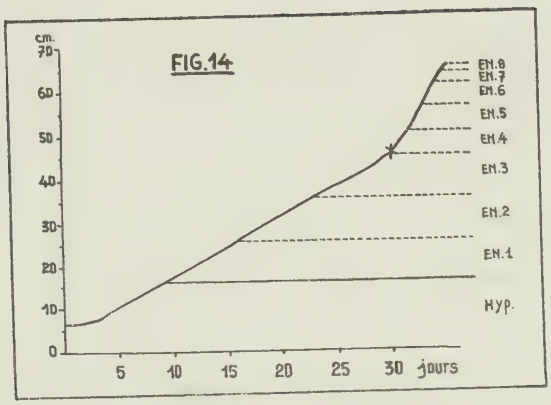
B) ASPECTS BIOMETRIQUES.

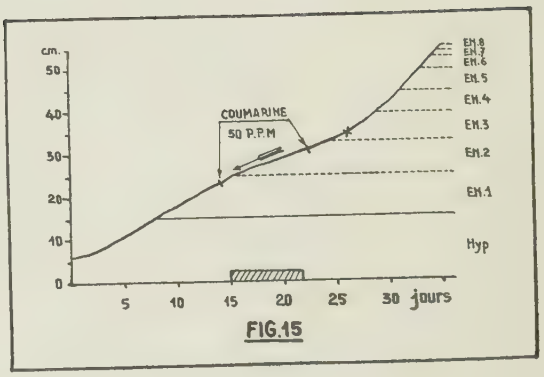
Les mesures, effectuées quotidiennement à la même heure, pour une quinzaine de sujets des trois séries, ont permis d'établir les courbes de croissance en fonction du temps reproduites dans les figures 14, 15, 16.

Nous constatons (fig. 15) que la croissance des plants traités CMA à 50 ppM ne montre pas de différence notable avec celle des témoins, sauf une pente plus faible de la courbe surtout dans les derniers jours.

Il en est tout autrement pour les sujets traités CMA à 100 ppM (fig. 16) où la pente de la courbe globale de croissance s'abaisse considérablement et s'annule même vers la fin du traitement (que nous avons d'ailleurs interrompu pour cette raison).

L'inhibition de croissance, que l'aspect morphologique faisait prévoir, apparait encore plus nettement dans cette courbe. Nos mesures permettent de préciser que les entre-noeuds dégagés ne subissent qu'une élongation minime et que le 35ème jour après le repiquage les plants ont terminé leur développement et sont près de leur fin.





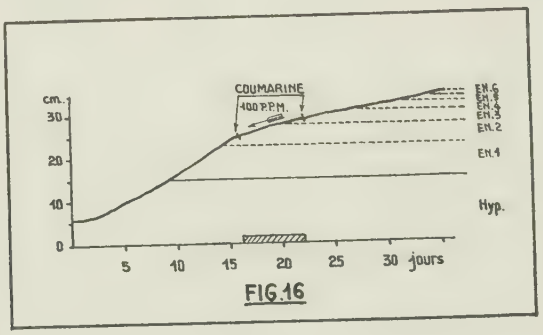


Fig. 14 : Courbe de croissance en fonction du temps (graines de 1962). Plant TEM.

Fig. 15 : Plant CMA (50 ppM).

Fig. 16 : Plant CMA (100 ppM).

Nous groupons dans la figure 17 pour deux plants traités CMA l'un avec la solution à 50 ppM, l'autre à 100 ppM, les diagrammes des longueurs finales des entre-noeuds. Nous voyons que leur schéma général est totalement différent de celui d'un plant témoin (fig. 2). Alors que chez les témoins, les E-N, du 1er au 4ème sont de plus en plus longs, le traitement a pour effet immédiat d'inhiber l'élongation du 2ème E-N dont la longueur reste plus faible que celle du premier, et le processus s'aggrave pour les suivants qui sont de plus en plus courts. Ce fait se produit dans les deux séries, mais comme nous l'avons vu, le phénomène s'accentue pour les sujets traités avec la solution forte de coumarine.

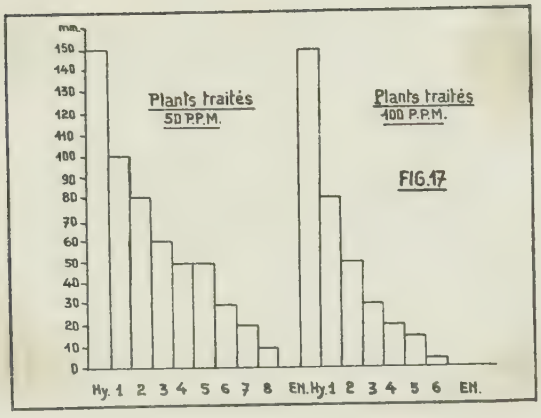


Fig. 17 : Diagramme des longueurs finales des E-N pour des plants traités à la coumarine (50 et 100 ppM). Noter la taille décroissante des E-N (cf. fig. 2).

DISCUSSION.

Considérons d'abord l'effet produit sur P. tataricum par la solution forte à 100 ppM. L'inhibition de croissance et de développement est spectaculaire et porte aussi bien sur la taille, le nombre des entre-noeuds et la morphologie des feuilles. Rappelons que ces plants ne fleurissent pas. Ce résultat était prévisible, la coumarine étant une substance réputée fortement inhibitrice.

Pour les plants traités CMA avec la solution à 50 ppM, s'ils ont un aspect presque normal, s'ils atteignent une taille de peu inférieure à celle des témoins, et si leur floraison se produit à peu près normalement, nous observons cependant une anomalie dans la croissance relative des entre-noeuds successifs. Le traitement a eu pour effet de supprimer la poussée de croissance qui se traduit - chez les témoins - par un allongement plus intense du 4ème E-N.

Ce fait constitue, à notre sens, un symptôme important qui apporte la preuve d'une désharmonie de croissance provoquée par la coumarine.

V

ENSEMBLE DES RESULTATS CONCERNANT LA MORPHOLOGIE, LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT DE POLYGONUM TATARICUM SOUMIS A DIVERS TRAITEMENTS

Nos essais expérimentaux ont eu pour but de mettre en évidence les réactions de Polygonum tataricum L. à divers traitements consistant en applications de substances connues et devant notoirement provoquer des effets très différents. Nous avons testé à cet égard :

- l'acide gibberellique, dont l'action favorable sur la croissance de la tige et corrélativement sur l'induction de mouvements révolutifs est maintenant bien établie (167, 172);

- la kinétine qui est considérée comme un régulateur de croissance ayant tendance à supprimer la dominance apicale (152, 171);

- la coumarine qui, au contraire, agit comme inhibiteur (64).

Dans tous nos essais, en vue d'obtenir le maximum d'effet, nous nous sommes efforcé d'appliquer le traitement le plus précocement possible. Pour l'acide gibberellique et la kinétine, nous avons traité les plantules dès après le repiquage; pour la coumarine, nous avons dû attendre que les plants aient une vigueur suffisante pour supporter le traitement.

L'acide gibberellique a été utilisé à une concentration (100 ppM) couramment employée au Laboratoire, et donnant d'une manière constante des résultats satisfaisants (35, 161 à 173). Pour la kinétine et la coumarine, nous avons testé deux concentrations : à 50 et à 100 ppM.

- Sous l'action du traitement gibberellique les plants de P. tataricum montrent une croissance plus rapide et une élongation accrue de leur tige en même temps que leur morphologie est modifiée dans le sens habituel : tige plus mince, pétioles et limbes plus allongés et plus étroits. Cependant on n'observe pas de mouvements révolutifs. Nos mesures de croissance ont établi que l'élongation journalière -beaucoup plus importante que pour les témoins - est répartie sur une plus grande longueur de la tige, et qu'ainsi aucun secteur de celle-ci ne subit, à aucun moment, un allongement réellement anormal.

Ces résultats concernant P. tataricum peuvent être comparés à cet égard avec ceux obtenus sur un autre Polygonum, P. aviculare qui réagit aussi à l'A G par une élongation accrue de la tige sans induction de mouvements de circumnutation (173), bien que le contenu en flavonoïdes en soit profondément modifié (197). Nous verrons plus loin que ce traitement a également entrainé pour notre espèce d'importants changements biochimiques.

- Le résultat le plus spectaculaire obtenu avec la kinétine est la formation de très nombreuses et très longues racines adventives sur les entrenoeuds inférieurs des plants traités. C'est la première fois, à notre connaissance, qu'un tel fait est observé sur des plantes entières - et non pour des boutures dont on sait que la kinétine favorise l'enracinement - (3) et son interprétation reste incertaine.

La taille des sujets traités KIN, plus grande que celle des témoins, rend cependant imparfaitement compte de l'effet positif de ce traitement sur le développement : ces plants étant beaucoup plus vigoureux, leur tige plus épaisse, et leurs feuilles plus larges et plus vertes, leur masse fraîche est plus élevée. Ainsi, bien que l'accroissement en longueur soit dans ce cas moins important que pour les sujets GIBB, le traitement à la kinétine (dans nos conditions de culture) s'est révélé très favorable au développement de P. tataricum.

- Les résultats sont tout différents avec la coumarine qui, employée à la concentration de 100 ppM, a inhibé le développement et pratiquement stoppé la croissance. L'aspect anormal de ces plants est encore exagéré par la réduction des limbes dont la marge se replie en dessous. Rappelons que cette série est la seule où il n'y ait pas eu de floraison.

Si la croissance des plants traités avec la solution faible (50 ppM) de coumarine semble au premier abord peu modifiée par rapport à celle des plants témoins, elle est en réalité fortement perturbée. Nous avons pu montrer, en effet, un bouleversement des corrélations entre les divers entre-noeuds qui fournit la preuve d'une importante désharmonie de croissance. L'étude des flavonoïdes permettra peut-être d'apporter quelques éclaircissements à ces faits.

DEUXIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS

I

ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

TECHNIQUE

Pour déterminer le contenu en flavonoides des plants témoins de Polygonum tataricum nous avons utilisé la méthode de chromatographie sur papier en double dimension qui nous a permis de dresser des cartes chromatographiques à partir des extraits éthanoliques. La même méthode a été employée pour les plants traités des séries expérimentales, et nous avons dû préparer une trentaine d'extraits, correspondant chacun à des régions, ou organes différents, soit de plants témoins, soit de sujets ayant été soumis aux divers traitements.

Pour toutes les séries, témoins (TEM), traitées à l'acide gibberellique (GIBB), à la kinétine (KIN) à 50 ou à 100 ppM, à la coumarine (CMA) à 50 ou à 100 ppM, et pour des sujets âgés de 33-35 jours, nous avons séparé :

1- les hypocotyles,
2- la région âgée de la tige épicotylée, correspondant aux 2-3 entre-noeuds inférieurs,
3- la région apicale de la tige principale et l'extrémité des rameaux florifères, encore en croissance,
4- les feuilles adultes (limbes et pétioles) de la moitié supérieure des plantes.

En vue de les comparer à la région hypocotylaire des sujets témoins de 35 jours, nous avons également récolté au moment du repiquage

5- les hypocotyles jeunes (2-3 jours après la germination).

Pour éliminer de possibles variations diurnes dans le contenu en flavonoides (117, 40, 208) et bien que les cultures soient faites en lumière continue, nous avons toujours procédé aux récoltes au même moment vers 10 heures du matin, et le même jour pour les sujets traités et la série TEM qui leur correspond. Nous n'utilisons que les parties très saines ne présentant ni tache, ni flétrissure.

PREPARATION DES EXTRAITS

Le matériel végétal est épuisé à chaud par l'éthanol aqueux (70-80%), les alcoolatures sont réunies et concentrées. L'extrait est d'abord reconnu par chromatographie pour déceler tous les spots avant déchlorophyllation, cette opération pouvant entrainer quelques substances dans la phase benzénique (197). Les divers extraits éthanoliques, soigneusement étiquetés et dotés chacun d'une micropipette, sont conservés au réfrigérateur.

TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE

Nous étudions les extraits par chromatographie descendante, en double dimension, sur papier Whatmann, dans des cuves Shandon (Voir 16, 19, 44, 46, 55, 56, 60, 94, 100, 120, 136, 145, 154, 155 et 214).

Pour permettre d'utiles comparaisons nous chromatographions toujours dans le système de solvants : butanol acétique / acide acétique à 2% qui permet de dresser la carte chromatographique de chaque extrait. Pour le travail de détermination des différents spots nous employons divers autres solvants convenablement choisis.

Solvants.

- Butanol acétique. C'est un solvant de 1ère dimension, constitué soit par la phase organique d'un mélange de n-butanol, acide acétique, eau (4/1/5, v/v) soit par le mélange monophasique n-butanol, acide acétique, eau (6/1/2, v/v).

- Acétate d'éthyle saturé d'eau et phénol saturé d'eau, également utilisés en 1ère dimension.

- Solvant de GRIFFITHS : benzène, acide acétique, eau (6/7/3, V/v, phase organique) employé en 1ère dimension pour séparer les acides phénoliques (48, 78) et les aglycones de coumarines.

Comme solvants de 2ème dimension on peut prendre diverses concentrations d'acide acétique : 2%, 15 et 60%. Ce dernier est utile pour mobiliser les aglycones de flavones et flavonols qui ne migrent que très peu dans l'acide acétique à 2 et à 15%.

Observation des chromatogrammes et réactifs.

Les chromatogrammes développés en double dimension et observés en lumière de Wood (3650 A) doivent être soumis à divers réactifs pour la détection de tous les spots :

1- en premier lieu les vapeurs d'ammoniac qui intensifient les fluorescences en en modifiant la teinte ou qui révèle même certaines substances (acide p-coumarique et dérivés, par exemple),
2- le chlorure d'aluminium (en solution méthanolique à 1%) qui permet de déceler de très faibles traces de dérivés de flavonols et de flavones,
3- l'acétate basique de plomb (1% dans l'eau) qui donne de belles fluorescences avec la plupart des flavonoides, et qui permet également de différencier les hétérosides de kaempferol de ceux de quercétine,
4- le réactif de BARTON (13), mélange extemporané de solutions à 1% dans l'eau de ferricyanure de potassium et de perchlorure de fer (1/1, v/v) constitue un réactif très sensible pour mettre en évidence des spots phénoliques invisibles en lumière ordinaire comme en ultra-violet,
5- le réactif de BENEDIKT (100) dont le comportement vis à vis des substances phénoliques (extinction de la fluorescence pour les orthodiphénols et intensification pour les autres, (REZNIK et EGGER 130) met en évidence un certain nombre de spots qui n'apparaissent pas avec les réactifs précédents.

Comme il a été reconnu au cours de précédentes recherches au Laboratoire (J. TRONCHET 174 à 199) l'emploi de ces cinq réactifs est absolument nécessaire pour dresser la carte chromatographique complète d'un extrait, tous les spots même faibles, étant alors décelés au moins par un d'entre eux. Cependant, nous utilisons également :

6- le carbonate de sodium à 1%,
7- la soude (NaOH-2N),
8- l'acide chlorhydrique (HCI-2N),
9- le permanganate de potassium (1%),
10- l'oxychlorure de zirconium (2% méthanolique),
11- solution d'ammoniaque (du commerce),
12- perchlorure de fer (1%).

Techniques d'identification des spots

Le comportement chromatographique et les valeurs de Rf des différents spots dans notre système de solvants habituel, ainsi que leurs teintes de fluorescence avec les cinq réactifs importants, fournissent dans la plupart des cas, des indications précieuses sur leur nature. Ainsi la présence de doubles spots en écho est la preuve qu'il s'agit d' acides cinnamiques ou de leurs dérivés (depsides ou esters), de fortes valeurs de Rf en 1ère dimension (quart gauche du chromatogramme) indiquent des aglycones. Les fluorescences avant et après les réactifs permettent également de classer les substances en différentes catégories (hétérosides de flavones ou flavonols, dérivés de coumarines ou d'acides cinnamiques). De plus les teintes de fluorescence étant différentes d'une aglycone à l' autre (bleu-violet pour l'acide p-coumarique, bleu-blanc pour l'esculétine) et semblables pour les dérivés d'une même aglycone, il est possible de reconnaitre sur un chromatogramme d'un extrait total tel spot comme dérivé probable de telle ou telle aglycone.

Pour un certain nombre de spots aisément reconnus (rutine, acide caféique) l'identification se réduit à une vérification faite en général par la méthode du "témoin interne" après chromatographie dans plusieurs solvants; pour les autres nous devons procéder systématiquement à des élutions, hydrolyses, etc...

Elution. Nous découpons, dans un grand nombre de chromatogrammes développés en double dimension sur du papier Whatmann épais (n° 3) le spot à déterminer. Une partie est réservée pour les hydrolyses, l'autre est éluée dans l'éthanol aqueux (50% en général). L'éluat, concentré, est chromatographié d'abord dans notre système de solvants habituel (pour vérification); puis dans d'autres solvants, ses valeurs de Rf sont alors calculées.

Dans des extraits complexes les substances en mélange se gènent les unes les autres, et leurs Rf en sont modifiés. Seules les valeurs de Rf obtenues en chromatographiant des éluats de spots (et non de bandes) peuvent être prises en considération et comparée à celles de substances de référence ou à celles données par les auteurs. Les éluats de spots sont utilisés également pour la méthode du témoin interne qui consiste à ajouter au spot de départ une substance connue. Après développement dans plusieurs systèmes de solvants, la superposition des deux substances est une sérieuse présomption de leur identité.

Cependant ce travail ne doit être fait qu'après la détermination de l'aglycone du spot à identifier.

Techniques d'hydrolyse

Le point essentiel de l'identification d'un spot est de reconnaitre son aglycone. S'il s'agit d'un hétéroside de flavone ou flavonol, ou d'un dérivé d'acide phénolique ou de coumarine, on procède à une hydrolyse acide. Pour certains dérivés d'acides cinnamiques l'hydrolyse alcaline donne de meilleurs résultats.

Hydrolyse acide

Elle peut être effectuée soit sur l'extrait total, soit sur des spots isolés, découpés dans des chromatogrammes, soit sur le chromatogramme lui même.

Hydrolyse de l'extrait total

Un volume de l'extrait éthanolique est additionné de 3 volumes d'acide chlorhydrique (ou sulfurique) 2N, et maintenu au bain-marie bouillant de 40 à 60 minutes. Après refroidissement, les aglycones sont extraites à l'acétate d'éthyle. Les fractions d'acétate d'éthyle sont regroupées, puis concentrées, et soumises à chromatographie, d'abord dans le système de solvants habituel. Le chromatogramme obtenu, comparé avec celui de l'extrait total, permet de contrôler l'hydrolyse et éventuellement de repérer les spots réfractaires, qui bien que n'étant pas des aglycones, restent inchangés.

Cette hydrolyse de l'extrait total - qui doit toujours être effectuée - donne habituellement de précieuses indications sur la nature des spots disparus (et remplacés par leur aglycone) mais également sur les spots réfractaires, par exemple acide chlorogénique qui demanderait un temps d'hydrolyse plus prolongé, ou hétéroside qu'on doit alors ranger dans une catégorie spéciale.

L'étude chromatographique des hydrolysats dans d'autres solvants convenablement choisis, donne des indications sur les aglycones obtenues mais se révèle insuffisante et doit être complétée par l'hydrolyse de chaque spot.

Mise en évidence des anthocyanidines

Pour tous les extraits totaux, même si aucun pigment anthocyanique n'est reconnu, nous opérons systématiquement la recherche des anthocyanidines. Après l'hydrolyse acide et l'extraction des aglycones à l'acétate d'éthyle, nous épuisons la phase résiduelle avec une petite quantité d'alcool iso-amylique. La présence d'anthocyanidines est mise en évidence par la coloration de la phase alcoolique.

Hydrolyse des spots

Dans ce cas les spots découpés sont recouverts d'une solution d'acide chlorhydrique à 20% et maintenus au bain-marie bouillant pendant un laps de temps qui peut varier de 2 minutes à 4 heures. Le temps d'hydrolyse est très différent suivant les substances. Pour les dérivés de

coumarines, 4 minutes suffisent en général alors que la plupart des hétérosides de quercétine et de kaempferol ne libèrent leur aglycone qu'après 15-20 minutes. Pour ces derniers d'ailleurs le temps nécessaire pour l'hydrolyse diffère beaucoup d'un cas à l'autre et a été récemment (HARBORNE 60) indiqué comme un moyen de caractérisation des hétérosides. En effet, la vitesse d'hydrolyse dépend à la fois des molécules de sucre etc.. fixées : très rapide pour le rhamnose (2-3 minutes) lente pour l'acide glucuronique (1 à 4 heures) et du point d'attache (3- glucoside ----- 4'-glucoside ----- 7- glucoside).

Lorsqu'un spot résiste à une hydrolyse acide prolongée pendant plus de quatre heures on doit penser qu'il s'agit d'un C-glycoside de flavone. Nous verrons que nous nous sommes heurté à cette difficulté pour certains hétérosides dans nos extraits.

Pour quelques dérivés de coumarines ou d'acides cinnamiques une hydrolyse de quelques minutes seulement entraine parfois la dégradation des molécules; dans ce cas, il est préférable d'employer une solution acide plus faible (5%) et d'hydrolyser pendant le même temps.

La phase résiduaire contenant les sucres, débarrassée de l'acide chlorhydrique par chauffage, puis concentrée, est soumise à chromatographie en vue de leur détermination.

Hydrolyse sur le chromatogramme même

Il est avantageux dans certains cas de pouvoir repérer l'aglycone en place sur le spot qui en dérive. Pour cela on opère une hydrolyse sur le chromatogramme. Après avoir soigneusement marqué tous les spots, on pulvérise une solution à 20% (v/v) d'acide tri-chloracétique dans l'eau. Après passage à l'étuve à 70° pendant 5-10 minutes, le chromatogramme est observé en lumière de Wood, chaque spot est remplacé par son aglycone (81).

Hydrolyse alcaline

Les spots découpés sont recouverts d'une solution de soude 2N et laissés 4-5 heures, à froid, dans une atmosphère d'azote ou sous une cloche à vide (ce dernier procédé utilisé au Laboratoire donnant de bons résultats). Après ce temps on acidifie à pH 3 et on extrait les aglycones à l'acétate d'éthyle comme pour l'hydrolyse acide.

SPECTROSCOPIE.

La détermination des substances peut être confirmée par l'étude de leur spectre d'absorption dans l'ultra-violet, un grand nombre d'auteurs ayant donné les caractéristiques spectrales des polyphénols (voir GEISSMAN 46, JURD 83 et HARBORNE 58).

Nous utilisons un spectrophotomètre OPTICA (C F 4 Grating Spectrophotometer).

L'éluat de spot est purifié par re-chromatographie sur papier, puis repris dans l'éthanol à 95%. Nous étudions successivement le spectre de la substance :

1) en solution éthanolique,
2) en présence d'alcalis (solution éthanolique + NaOH 0,1%, 1/1, v/v),
3) avec du chlorure d'aluminium (solution éthanolique + 2-3 gouttes d' $ALCI_3$ à 0,5%),
4) ou d'acétate de sodium (solution éthanolique saturée d'acétate de Na cristallisé).

En résumé, pour l'identification d'une substance, nous reconnaissons d'abord la nature de son aglycone. Ensuite la comparaison de ses valeurs de Rf - à partir d'éluats - dans plusieurs solvants, avec ceux de substances connues en permet presque toujours la détermination. La vérification est poursuivie ensuite par l'étude de son spectre en ultra-violet comme par la méthode du témoin interne pour laquelle nous utilisons soit des substances pures du commerce, soit des substances obtenues à partir du matériel végétal où elles ont été décrites. Au cours du travail nous préciserons les techniques utilisées pour chaque spot et notamment les temps d'hydrolyse.

Les substances étant identifiées et la carte chromatographique dressée, la comparaison avec un autre extrait fait apparaître non seulement des différences qualitatives mais aussi quantitatives. Le problème consiste alors à charger plus ou moins les spots de départ de manière à ce qu'un spot - pris comme référence - soit de force égale dans les deux chromatogrammes après développement. Nous n'avons pu choisir la rutine comme substance de référence, son taux étant très variable suivant les régions considérées et les traitements subis par les plants. Il nous a paru commode de prendre l'un ou l'autre des acides chlorogéniques. Dans tous les cas, l'application de l'extrait se fait par touches successives, en plus ou moins grand nombre, mais le spot de départ a toujours le même diamètre (7-8 mm).

II

HISTORIQUE

Depuis plus d'un siècle (SHUNK 139) il est connu que les feuilles de Polygonum fagopyrum contiennent un pigment jaune, la rutine. En 1908, WUNDERLICH (215) la retrouve dans les fleurs sèches de la même espèce et BRANDL et SCHARTEL (21) confirment le fait. Il faut attendre 1949 (COUCH et alii 32) pour que la présence de rutine soit signalée également dans P. tataricum. Ces deux espèces constituent d'ailleurs une importante source de rutine pour l'industrie pharmaceutique.

Les autres constituants flavoniques de P. fagopyrum sont mal connus. Si NAGAI (115) indique la présence d'un autre pigment dans les plantules étiolées, ni KUILMAN (91) ni KARSTENS (85) ne peuvent le retrouver. D'ailleurs pour les deux espèces les recherches sont presque exclusivement axées sur la rutine (NOELL 117, AHLGRIM 1,2) et notamment ses variations en fonction de l'âge de la plante, des conditions de culture, etc...

HANSEL et HÖRHAMMER (54) trouvent en plus de la rutine de l'hypérine et de la quercitrine dans P. fagopyrum, et de l'hypérine dans P. tataricum et signalent dans les deux espèces un glycoside non déterminé, la seule aglycone obtenue étant de la quercétine.

HÖRHAMMER et SCHERM (68)au cours d'une étude systématique sur les Polygonacées et les Bétulacées indiquent la présence d'acides caféique, chlorogénique et protocatéchique dans les "pousses" de P. tataricum.

TROYER (200, 201, 202), étudiant les plantules de P. fagopyrum reconnaît la présence, en plus de la rutine, de quatre hétérosides, donne leurs valeurs de Rf, quelques réactions colorées ainsi que leur spectre d'absorption dans l'ultra-violet, mais ne parvient pas à préciser leur nature.

Ainsi, pour P. fagopyrum le travail d'identification de ces hétérosides reste à faire, et il en est de même pour P. tataricum où de plus le très petit nombre de renseignements (54, 68) se rapporte aux "pousses" (c'est à dire tiges + feuilles). C'est pour cette raison que nous avons préféré travailler sur P. tataricum. Nous essaierons de préciser pour cette espèce la nature de toutes les substances accompagnant la rutine, en étudiant séparément les feuilles et la tige, cette dernière aux divers niveaux correspondant à des âges physiologiques différents. Le même travail sera poursuivi pour les sujets soumis à divers traitements.

III

RESULTATS

A. CONTENU EN FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS DE POLYGONUM TATARICUM

Pour les plants témoins de P. tataricum âgés de 33 jours nous envisageons successivement le contenu en flavonoides des régions hypocotylaires de la tige, des portions les plus âgées de la tige épicotylée, puis des régions apicales et enfin des feuilles. La comparaison des hypocotyles âgés à de jeunes hypocotyles récoltés le 3ème jour après le semis nous permettra d'étudier l'effet du vieillissement.

1) LES FLAVONOIDES DES HYPOCOTYLES AGES.

Nous donnons dans la figure 18 un chromatogramme d'extrait de la portion la plus basale de la tige (correspondant à la région hypocotylaire), développé dans le double système de solvants butanol acétique/ acide acétique à 2%.

Nous observons quatre spots bruns en lumière de Wood R et H, K_1 et K_2 très faibles; un pigment anthocyanique A, et deux doubles spots C_1 - C'_1 et C_2 - C'_2, fluoresçant bleu en lumière ultraviolette. Les spots K_1 et K_2, n'apparaissent nettement qu'avec le chlorure d'Al.

Hydrolyse de l'extrait total.

La chromatographie de contrôle de l'extrait total hydrolysé (HCl-2N, 40 minutes, bain-marie bouillant) montre la disparition complète des spots bruns et de A, qui sont donc des hétérosides et la diminution des spots C_1 et C_2.

Nous voyons apparaître trois aglycones, deux à fluorescence jaune à mobilité presque nulle dans l'acide acétique à 2% (deux flavonols) et une fluoresçant bleu clair, et donnant un double spot en deuxième dimension (il s'agit d'un acide cinnamique). Par ailleurs, l'aglycone du spot A, une anthocyanidine, colore très fortement en rouge la phase d'alcool amylique.

Nous allons considérer chaque spot séparément en vue de son identification.

Détermination du spot R = rutine.

Nous reconnaissons dans le spot R, tant par sa position chromatographique que par ses réactions colorées (voir tableau 1) la rutine, 3-rhamno-glucoside de quercétine, très fréquemment observée dans les organes volubiles (J. TRONCHET 174 à 199), et que nous retrouverons dans tous les

extraits de P. tataricum (Rf butanol acétique : 0,45; 2,[illegible] : 0,29).

Par hydrolyse acide (HCl 20%, 20 minutes) on obtient le flavonol quercétine (3, 5, 7, 3', 4' - pentahydroxyflavone), du rhamnose et du glucose.

La détermination de la quercétine est vérifiée par co-chromatographie avec de la quercétine du commerce dans plusieurs solvants et notamment butanol acétique / acide acétique 60% (Rf : 0,68 et 0,40).

Le spot R ne peut être séparé par chromatographie en deux dimensions dans plusieurs systèmes de solvants, de la rutine du commerce (ajoutée au spot de départ). Son identification ne peut laisser de doute. D'ailleurs nous avons vérifié que sa courbe d'absorption en U V est semblable à celle donnée par les auteurs.

TABLEAU I

Substance	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de plomb	$AlCl_3$ + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de Barton
Spot R	Brun	Orangé rouge	Orangé	Jaune orangé	-	+
Rutine du commerce	Brun	Orangé rouge	Orangé	Jaune orangé	-	+
Aglycone Spot R	Jaune	Jaune	Orangé	Jaune	-	+
Quercétine du commerce	Jaune	Jaune	Orangé	Jaune	-	+

Détermination du spot H = hypérine.

Ce spot, brun aux U V (voir tableau II) disparaît par hydrolyse dans l'extrait total, il s'agit donc d'un hétéroside. Pour préciser sa nature nous procédons à l'hydrolyse acide sur des spots isolés (HCl 20% 6 minutes). L'aglycone est un flavonol, facilement identifié à la quercétine.

Le spot H est donc un 3-hétéroside de quercétine. Sa position chromatographique - celle d'un mono-glycoside - fait penser à l'hypérine (3- mono galactoside de quercétine) ou à l'isoquercitrine (3- mono glucoside de quercétine) qui ont des valeurs de RF très voisines : respectivement 0,55 et 0,58 dans le butanol acétique; 0,35 et 0,37 dans l'acide acétique à 15% (56); 0,13 et 0,14 dans l'acide acétique à 2%.

Nous disposons d'une solution d'hypérine, isolée d'extrait de feuilles de Hypericum perforatum où elle a été signalée (50) et d'une solution d'isoquercitrine préparée à partir d'extrait de feuilles de Vaccinium myrtillus (79). Dans ce cas la méthode du témoin interne est appliquée en augmentant les temps de développement dans les deux dimensions pour accuser les faibles différences de Rf.

Dans ces conditions, c'est avec l'hypérine de H. perforatum qu'on obtient la superposition sur le spot H et non avec l'isoquercitrine.

Le spot H est ainsi vraisemblablement de l'hypérine.

TABLEAU II

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de plomb	$AlCl_3$ + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de Barton
Spot H	Brun	Orangé brun	Orangé	Orangé jaune	-	+
Hypérine (de Hypericum perforatum	Brun	Orangé brun	Orangé	Orangé jaune	-	+
Aglycone Spot H	Jaune	Jaune	Orangé	Jaune	-	+
Quercétine du commerce	Jaune	Jaune	Orangé	Jaune	-	+

La présence d'hypérine dans P. tataricum a été reconnue par HANSEL et HÖRHAMMER (54) qui par hydrolyse acide obtiennent quercétine et galactose, mais ces auteurs travaillent sur les "pousses" et ne donnent ainsi pas de précision sur la localisation de cet hétéroside. Or si nous le trouvons dans les tiges de plants adultes, nous verrons qu'il est totalement absent dans les feuilles.

Détermination du spot K_1 = 3 - rhamno glucoside de kaempferol.

Un grand nombre de spots K_1 découpés dans des chromatogrammes sont soumis à une hydrolyse acide dans HCl 20% (20 minutes au bain-marie bouillant). Après extraction à l'acétate d'éthyle, l'aglycone est chromatographiée, d'abord dans notre système de solvants habituel, pour contrôle de l'efficacité de l'hydrolyse, puis dans d'autres systèmes de solvants comprenant notamment de l'acide acétique à 60% en deuxième dimension.

L'aglycone obtenue, jaune en lumière de Wood (tableau 3) donne une réaction positive au BARTON comme au BENEDIKT, ce qui fournit la preuve qu'il s'agit d'une substance phénolique n'ayant pas d'hydroxyles adjacents. Ses réactions colorées (fluorescence jaune avec l'acétate basique de Pb) sont celles du kaempferol (3, 5, 7, 3'- tetra-hydroxyflavone). Ses valeurs de Rf dans plusieurs solvants correspondent à celles données dans la littérature pour le même flavonol (butanol acétique : 0,83; acide acétique 60% : 0,50; 15% : 0,10, phénol : 0,58).

Pour vérifier la détermination, nous comparons cette aglycone avec de l'authentique kaempferol extrait de feuilles de thé (ROBERTS 135). La superposition est parfaite dans tous les systèmes de solvants utilisés.

Ainsi K_1, brun en ultra violet, est un 3-hétéroside de kaempferol. Sa position chromatographique, par rapport à la rutine, le fait reconnaitre (24) comme le dérivé de kaempferol homologue de celle-ci, c'est à dire le 3-rhamno-glucoside de kaempferol. Son identification est contrôlée par comparaison avec la même substance isolée d'extrait de feuilles de thé.

TABLEAU III

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de Plomb	$AlCl_3$ + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de Barton
Spot K_1	Brun	Jaune	Jaune vert	Jaune	+	+
Spot K_2	Brun	Jaune	Jaune vert	Jaune	+	+
Aglycones Spots K_1 et K_2	Jaune	Jaune	Jaune vert	Jaune vert	+	+
Kaempferol pur	Jaune	Jaune	Jaune vert	Jaune vert	+	+

Détermination du spot K_2 = 3-mono glycoside de kaempferol (sans doute 3-galactoside).

Nous effectuons le même travail sur le spot K_2 qui a les mêmes réactions colorées que K_1 tableau III) et donne également par hydrolyse du kaempferol.

Si nous comparons ses valeurs de Rf à celles de K_1, nous constatons qu'elles sont à la fois plus élevées dans le butanol acétique et plus faibles dans le solvant aqueux. Il s'agit donc d'une 3-mono glycoside. Sa position chromatographique rappelle à très peu près celle du 3-glucoside de kaempferol ou astragaline. Cependant le fait que K_1 (dérivé de kaempferol)) soit l'homologue de R (dérivé de quercétine) rend très improbable la coexistence dans le même organe d'un 3-monogalactoside de quercétine (H) et d'un 3- mono glucoside de kaempferol. D'ailleurs l'essai de superposition d'astragaline sur notre spot K_2 n'est pas satisfaisant et nous estimons que K_2 doit être plutôt le 3-mono galactoside de kaempferol ou trifoline. Nous n'avons trouvé sur cette substance aucun renseignement concernant ses valeurs de Rf, ni ses réactions colorées, et nous n'avons pu nous en procurer. Le spot K_2 reste donc partiellement indéterminé.

Détermination de C_1-C'_1 et C_2-C'_2 = acides chlorogéniques.

Les doubles spots C_1-C'_1 et C_2-C'_2 ont la position chromatographique et les réactions colorées (tableau IV) des acides chlorogéniques (chlorogénique vrai et néo-chlorogénique) accompagnant très fréquemment les hétérosides de quercétine (174 à 199) dans les organes volubiles et répandus dans bon nombre de familles (POLITIS 123, 124).

Nous avons testé le double spot C_1-C'_1 avec le réactif d'HOFFNER (142), spécifique de l'acide chlorogénique. On pulvérise une solution de nitrite de Na à 1% dans de l'acide acétique à 10%, on obtient la coloration jaune caractéristique.

Les acides chlorogéniques étant très résistants à l'hydrolyse acide celle-ci doit être prolongée (3heures). Nous avons obtenu pour les deux doubles spots de l'acide caféique et dans la phase résiduelle de l'acide quinique.

Si la détermination de l'acide caféique est facile, celle de l'acide quinique - invisible en lumière naturelle comme en lumière de Wood - présente quelque difficulté. Nous avons appliqué le test d'EDWARD et WALDRON modifié par CARTWRIGHT et ROBERTS (26). Nous pulvérisons sur le chromatogramme une solution saturée de métapériodate de Na diluée au 1/3, puis 20 minutes après une solution de nitroprussiate de Na (50 mg) et de pipérazine (50 mg) dans l'eau (2cc) et éthanol (10 cc). Le chromatogramme, placé 10 minutes dans une étuve à 100° C montre un fort spot orangé, caractéristique de l'acide quinique.

L'acide caféique, extrait par l'acétate d'éthyle, est chromatographié dans plusieurs solvants et comparé à de l'acide caféique du commerce.

Le double spot C_1-C'_1 ne peut être séparé par chromatographie de l'acide chlorogénique vrai isolé d'un extrait de feuilles de thé (132) et le double spot C_2-C'_2 correspond exactement à l'acide néo-chlorogénique de même provenance.

TABLEAU IV

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de plomb	$AlCl_3$ + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de Barton	Réactif de HOFFNER
Spot C_1-C'_1	Bleu	Vert jaune	Jaune	Jaune	-	+ +	Jaune
Spot C_2-C'_2	Bleu	Vert jaune	Jaune	Jaune	-	+ +	
Acide chlorogénique vrai feuilles de Thé	Bleu	Vert jaune	Jaune	Jaune	-	+ +	Jaune
Acide néochlorogénique feuilles de Thé	Bleu	Vert jaune	Jaune	Jaune	-	+ +	
Aglycone C_1-C'_1	Bleu	Bleu	Jaune	Jaune	-	+ +	
Aglycone C_2-C'_2	Bleu	Bleu	Jaune	Jaune	-	+ +	
Acide caféique du commerce	Bleu	Bleu	Jaune	Jaune	-	+ +	

En résumé les hypocotyles âgés contiennent deux hétérosides de quercétine l'hyperine et la rutine, deux hétérosides homologues de kaempferol, de l'acide chlorogénique vrai et de l'acide néo-chlorogénique et un pigment anthocyanique.

2) LES FLAVONOIDES DE LA REGION BASALE DE LA TIGE EPICOTYLAIRE.

Les parties âgées de tige épicotylaire sont prélevées le 33ème jour après le repiquage sur des plants témoins et correspondent aux trois premiers entre-noeuds épicotylés, qui ont terminé leur croissance depuis plus de quinze jours.

La figure 19, montre à côté des acides chlorogéniques qui servent de référence de très faibles spots de rutine (R) et d'hypérine (H). En revanche le spot d'anthocyane est assez important.

L'hydrolyse de l'extrait total fait disparaître tous les spots d'hétérosides (R, H et A). Les aglycones obtenues (quercétine et acide caféique, ce dernier provenant des acides chlorogéniques partiellement hydrolysés) sont facilement identifiées. La phase d'alcool iso-amylique est fortement colorée en rouge par l'anthocyanidine. Pour ces régions très âgées, nous ne voyons apparaître aucune nouvelle aglycone et les chromatogrammes de l'hydrolysat, comme ceux de l'extrait total, ne montrent aucun spot nouveau. En particulier, le réactif de BARTON ne révèle aucun autre polyphénol, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre pour des régions vieillies (cf. P. aviculare 197).

Nous avons vérifié l'identité de chacune des substances présentes dans l'extrait par des superpositions d'éluats des spots correspondants des hypocotyles.

En résumé, les régions âgées de la tige épicotylaire contiennent, avec peu de rutine et d'hypérine, des acides chlorogéniques et un pigment anthocyanique.

3) LES FLAVONOIDES DE LA RÉGION APICALE DES TIGES.

L'extrait que nous allons étudier correspond aux régions nouvellement formées de tiges des plants témoins âgés de 33 jours.

Le chromatogramme de la figure 20 nous montre des spots déjà reconnus : la rutine R, l'hypérine H, les acides chlorogéniques et le spot A d'anthocyane (ce dernier très faible).

Par rapport aux acides chlorogéniques, pris comme référence, la rutine, dominante, donne un spot large et dense; l'hypérine, en revanche est très faible, et n'apparaît qu'après pulvérisation de chlorure d'aluminium.

En résumé, dans les régions jeunes de tiges de plants de 33 jours, nous observons un fort spot de rutine, des traces d'hypérine, des acides chlorogéniques et un pigment anthocyanique très réduit.

4) LES FLAVONOIDES DES FEUILLES.

Pour les plants témoins de P. tataricum nous avons étudié également les flavonoides des feuilles adultes (limbes + pétioles) qui montrent d'importantes différences avec ceux observés dans les tiges ou les hypocotyles.

Dans la figure 21 nous donnons un chromatogramme développé comme d'habitude dans le double système de solvants : butanol acétique / acide acétique 2%. Nous retrouvons la rutine et les acides chlorogénique vrai et néochlorogénique et nous voyons apparaître 3 spots, bruns en lumière de

Wood, dont l'un, après certains réactifs (tableau V) se montre non homogène mais formé de deux spots juxtaposés V et Ho. Nous avons ainsi quatre spots O, Ho, V et S dont les valeurs de Rf dans le butanol acétique sont respectivement 0, 32, 0,45, 0,44 et 0,59. Pour séparer les deux spots contigus V et Ho (Rf très voisins dans le butanol acétique et trop peu différents dans l'acide acétique à 2%) nous avons dû utiliser en 2ème dimension l'acide acétique à 15% qui les sépare mieux (valeurs de Rf : 0,23, 0,39, 0,33 et 0,52).

D'après leurs réactions colorées, ces quatre spots se séparent en deux groupes : O, Ho, V et S. Les spots O et Ho donnent une fluorescence orangé rabattu avec l'acétate basique de Pb alors que V et S apparaissent jaune vert. De plus, avec le réactif de BENEDIKT ils réagissent différemment : O et Ho restent bruns (ce qui indique des hydroxyles libres adjacents) alors que V et S fluorescent jaune.

Ces réactions opposées font penser que les deux groupes dérivent d'aglycones différentes, dont l'une serait un ortho-diphénol et l'autre non.

TABLEAU V

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de plomb	$AlCl_3$ + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de BARTON
Spot O Orientine pure	Brun Brun	Orangé Orangé	Orangé Orangé	Orange jaune Orange jaune	- -	+ +
Spot Ho Homo-Orientine pure	Brun Brun	Orangé Orangé	Orangé Orangé	Orange jaune Orange jaune	- -	+ +
Spot V Vitexine pure	Brun Brun	Jaune vert Jaune vert	Jaune vert Jaune vert	Jaune vert Jaune vert	+ +	+ +
Spot S Saponaretine pure	Brun Brun	Jaune vert Jaune vert	Jaune vert Jaune vert	Jaune vert Jaune vert	+ +	+ +

Figure 18 :

Carte chrmatographique (lère dimension : butanol acétique 4/1/5; 2ème dimension : acide acétique 2%). Plant TEM, hypocotyle âgé. R= rutine, (3-rhamnoglucoside de Quercétine); A = anthocyane; H = hypérine, (3-monogalactoside de Quercétine); K_1 = 3-rhamnoglucoside de kaempferol; K_2 = 3-mono galactoside de kaempferol (?); C_1-C'_1 = acide chlorogénique vrai; C_2-C'_2 = acide néo chlorogénique.

Figure 19 :

Plant TEM, portions âgées de tiges épicotylées. (Voir légende de la figure 18).

Figure 20 :

Plant TEM, régions jeunes de tiges. (Voir légende de la figure 18).

Figure 21 :

Plant TEM, feuilles adultes. O = orientine; Ho = homo orientine C-glycosides de luteoline; V = vitexine; S = saponarétine, C-glycosides d'apigénine (Voir fig. 18).

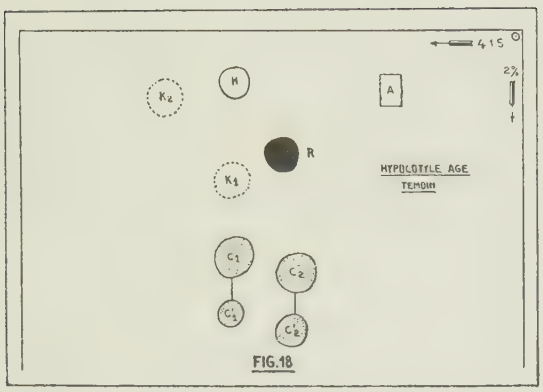


FIG.18

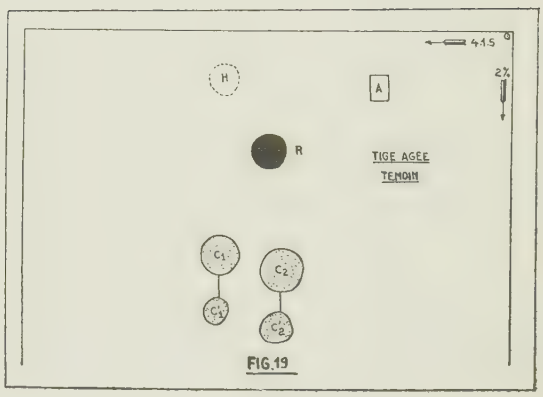


FIG.19

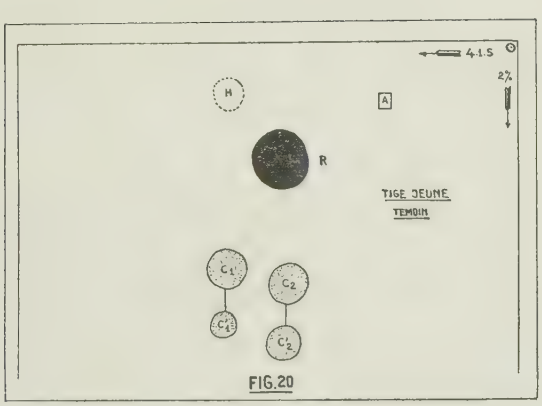


FIG.20

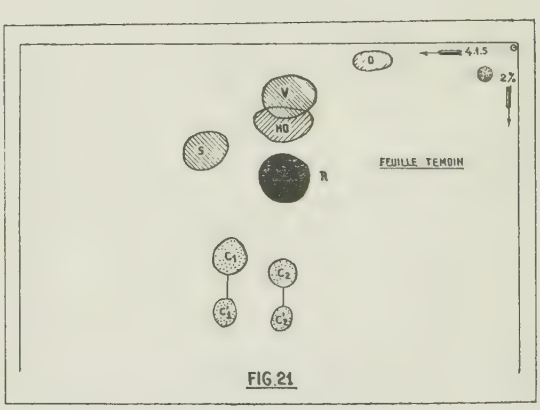


FIG.21

RECHERCHE DES AGLYCONES DES SPOTS O, Ho, V et S.

Nous procédons, comme nous avons l'habitude de le faire pour chaque extrait, à l'hydrolyse acide de l'extrait total.

Une hydrolyse acide de 60 minutes (HCl-2N) ne donne comme flavone ou flavonol que de la quercétine. Rappelons que d'après AHLGRIMM (1), HANSEL et HÖRHAMMER n'ont également obtenu que de la quercétine après hydrolyse d'un extrait de "pousses" de P. tataricum.

Or, au moins en ce qui concerne les spots V et S, il ne peut s'agir de dérivés de quercétine : ils donnent une fluorescence jaune (et non orangée comme les hétérosides de quercétine) avec l'acétate basique de Pb, et surtout, leur réaction au BENEDIKT fait la preuve qu'ils n'ont pas d'hydroxyles libres adjacents.

La chromatographie de contrôle de l'hydrolysat, dans le système de solvants butanol acétique / acide acétique 15%, montre que seule la rutine a disparu (en donnant la quercétine) les quatre autres spots bruns restant inchangés.

Nous avons repris l'hydrolyse acide de l'extrait total de feuilles de P. tataricum en augmentant soit le temps d'hydrolyse, soit la concentration de l'acide. Tous ces essais se sont soldés par des échecs.

Les quatre spots, bruns en lumière de Wood, et non hydrolysables, pourraient être des aglycones de flavones. Or les faibles valeurs de Rf dans le butanol acétique des spots O, Ho et V, et par ailleurs la mobilité de Ho, V et surtout S dans le solvant aqueux (eau ou acide acétique 2%) ne peuvent être le fait d'aglycones de flavones. En effet celles-ci ont des Rf très élevés (environ 0,90) dans le butanol acétique et en revanche sont très peu déplacées par l'eau ou l'acide acétique à 2%.

Ces quatre substances ne peuvent être ainsi que des hétérosides, et en vue de libérer leurs aglycones nous avons essayé des hydrolyses acides sur les spots isolés.

Hydrolyses acides des spots O, Ho, V et S.

Pour chacun de ces spots, nous avons procédé à des hydrolyses avec HCl 20%, d'abord pendant 10 minutes, puis en modifiant dans un sens ou dans l'autre le temps d'hydrolyse. Nous avons également utilisé des solutions d'acide à diverses concentrations. Dans tous les cas - même pour des hydrolyses prolongées pendant plusieurs heures - nous n'avons pu obtenir d'aglycone, la chromatographie de contrôle montrant soit les spots inchangés, soit la formation de substances de dégradation.

Cependant, dans certaines conditions, nous observons des faits qui font la preuve d'une parenté certaine entre les spots O et Ho et V et S. En effet, au cours d'un essai d'hydrolyse, nous avons obtenu à partir du spot O une petite quantité de Ho (et réciproquement) et à partir du spot V un léger spot S (et réciproquement). La transformation se produit plus nettement dans le sens O ----- Ho et V ----- S que dans le sens contraire.

HCl, 30 minutes

spot O ---------- spot O + spot Ho
spot V ---------- spot V + spot S
Il s'agit vraisemblablement d'isomères.

Identification des spots O = orientine, Ho = homo orientine, V = vitexine, S = saponarétine.

Les résultats négatifs des diverses hydrolyses rendent la détermination de ces substances très difficile et expliquent les imprécisions de TROYER (200) concernant les hétérosides A, B, C et D accompagnant la rutine dans les cotylédons de P. fagopyrum.

En 1958 HÖRHAMMER, WAGNER et GLOGENGIESSER (70) isolent dans Polygonum orientale deux hétérosides rebelles à l'hydrolyse acide, "l'orientine" et l'"orientoside" qu'ils montrent par hydrolyse enzymatique être respectivement des dérivés de lutéoline et d'apigénine.

En 1961, HÖRHAMMER et WAGNER (74) publient une mise au point sur ces nouveaux C-glycosides, réfractaires à l'hydrolyse acide et HARBORNE et HALL (59) décrivent dans des extraits de feuilles de Graminées de tels dérivés ou "glycoflavones". Ces auteurs et quelques autres (JURD 82, 83, SEIKEL 143, 144, 145, WAGNER 211, ARITOMI 4, 5) donnent pour ces substances des valeurs de Rf, spectres infra-rouges ou maximums d'absorption dans l'ultra-violet, etc...

Le comportement à l'hydrolyse acide de nos quatre spots fait penser qu'il peut s'agir de ces "glycoflavones" nouvellement étudiées, et les renseignements donnés par les auteurs nous confirment dans cette opinion.

Le Professeur HÖRHAMMER a bien voulu nous adresser un échantillon d'orientine et de vitexine, et le Dr HARBORNE de saponarétine et de homo orientine. Par la méthode du témoin interne, nous avons constamment obtenu la superposition de l'orientine et de notre spot O, de l'homo-orientine et du spot Ho, de la vitexine et du spot V et de la saponarétine et du spot S, en double dimension, dans plusieurs systèmes de solvants.

Ainsi, O et Ho sont des C-glycosides de lutéoline (5, 7, 3', 4'-tetra hydroxyflavone) dont ils ont d'ailleurs les réactions colorées (tableau V) alors que V et S sont des C-glycosides d'apigénine (5,7,3'- tri hydroxyflavone). Pour confirmation nous avons, pour ces quatre spots, étudié les spectres d'absorption dans l'ultra-violet.

ETUDE SPECTROPHOTOMETRIQUE.

Nous utilisons pour cette étude des éluats de spots dans l'éthanol à 95% et pour contrôle des éluats de papier chromatographique développé dans le même système de solvants.

Pour les quatre spots de glycoflavones nous donnons dans les figures 22, 23, 24 et 25 les spectres U V dans l'éthanol et dans l'éthanol-alcali. Pour éliminer l'effet de concentrations différentes nous avons

mis en abscisses non la densité optique, mais le logarithme d'absorption. Pour aucune de ces substances nous n'avons trouvé dans la littérature de courbes d'absorption, mais nos valeurs maximales correspondent à celles des différents auteurs.

Nous groupons dans le tableau VI, pour comparaison et documentation, nos propres résultats concernant les maximums d'absorption en U.V. dans divers milieux pour les quatre glycoflavones, et les valeurs données par les auteurs. La correspondance est satisfaisante et fournit la preuve de l'exactitude de notre identification.

Ces substances ont été dénommées "glycoflavones". Bien qu'ayant à plusieurs égards le comportement d'aglycones (résistance à l'hydrolyse acide, existence de dérivés glycosés) elles ne peuvent être considérées comme telles puisque leur molécule comprend une chaine osidique. Ce sont en effet des 8-C-glycosides de lutéoline ou d'apigénine. Leur structure exacte n'est pas encore définitivement établie.

Structure proposée pour l'orientine et l'homo orientine.

Dans la figure 26, nous donnons, à côté de la lutéoline dont elles dérivent, les formules développées de l'orientine et de l'homo-orientine d'après HÖRHAMMER et WAGNER (74). Cette structure est controversée par KOEPPEN (89) qui les considère cependant comme des C-glucopyranosyls de lutéoline (89 bis).

Figures 22, 23, 24 et 25 :

Spectres en U.V. (1) dans l'éthanol, (2) dans l'éthanol + NaOH de l'orientine, l'homo orientine, la vitexine et la saponarétine.

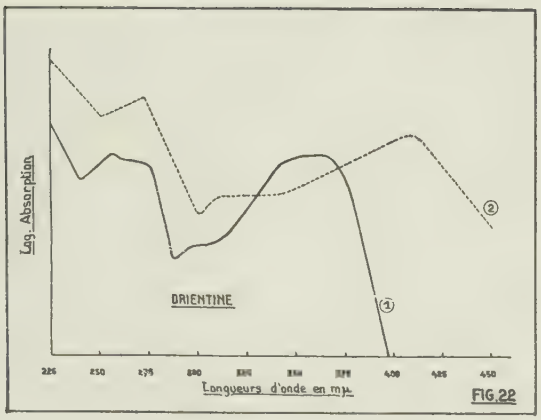


FIG.22

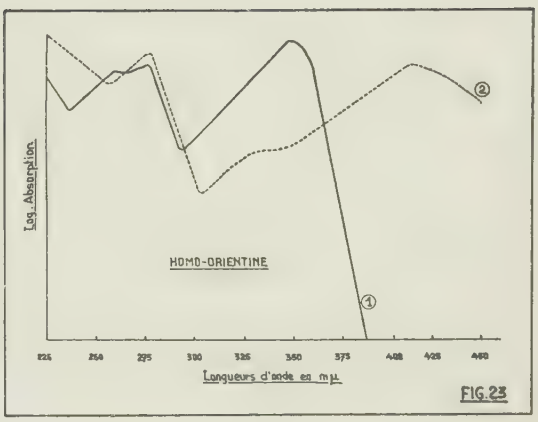


FIG.23

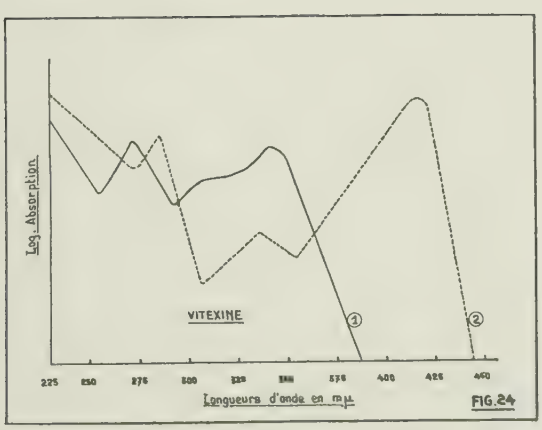


FIG.24

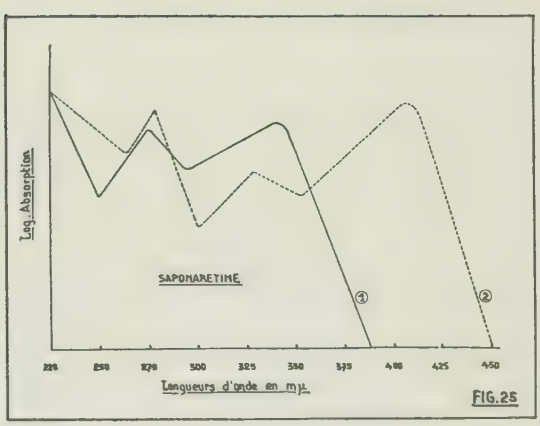


FIG.25

TABLEAU VI

SPECTRES D'ABSORPTION EN U.V.

Ethanol		Ethanol + alcali		Ethanol + $AlCl_3$		Ethanol + Acétate de Na		Ethanol + acétate de Na + acide borique		Références
I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	
ORIENTINE										
351	257	-		-		381	275	377	265	HÖRHAMMER (74)
351	251	-		-		-		-		JURD (83)
	260	-		-		325	273			
354	270					388	279	379	264	ARITOMI (4)
351	257	409	269	356 385	264	380	276	-		(nos valeurs
HOMO ORIENTINE										
350	258	-		-		381	275	377	265	HÖRHAMMER (74)
	262						272			
354	271	-		-		327	279	382	264	ARITOMI (4)
	259			358	-					
352	271	413	-	387		-	273	379	-	HARBORNE (59)
353	258	415	270	359 388	266	382	276	-		(Nos valeurs)
VITEXINE										
337	270	-		-		370	278	-		HÖRHAMMER (74)
335	270	-		341 371	279 304	-	281	-		JURD (83)
337	271	-		-		376	280 299	379	264	ARITOMI (4)
334	270	398	279	340 370	280 305	375	281	-		(Nos valeurs)
SAPONARETINE										
336	272	-		-		378	280	-		HÖRHAMMER (74)
340	273	-		-		384	280 299	382	264	ARITOMI (4)
337	272	403	278	375 342	281 306	380	280	-		(Nos valeurs)

Structure proposée pour la vitexine et la saponarétine.

Les formules développées de l'apigénine et de ses 8-C-glycosides saponarétine et vitexine, sont représentées dans la figure 27.

Depuis 1957 (EVANS et alii, 41) il était admis que la vitexine était un 8-C-glycoside d'apigénine (formule I). De nouvelles recherches (HOROWITZ et GENTILI 75) ont établi qu'il s'agit d'un 8-C-D-glucopyranoside d'apigénine (formule II). Quant à la saponarétine, isomère de la vitexine, sa structure fine n'est pas encore élucidée.

Une certaine confusion semble s'être instaurée concernant la terminologie, la même substance prenant des noms différents suivant les auteurs. Par exemple :

- orientine (HÖRHAMMER et alii 70, HÖRHAMMER et WAGNER 74) = lutexine (HARBORNE 59).
- homo orientine (HÖRHAMMER et WAGNER 74) = lutonarétine (HARBORNE 59).
- vitexine (PERKINS 1898, 122, EVANS et alii 41, HÖRHAMMER et WAGNER 74, HARBORNE 56) = orientoside (HÖRHAMMER et alii 70).
- saponarétine (HARBORNE 56, HÖRHAMMER et WAGNER 74) = homo vitexine (EVANS et alii 41) = isovitexine (HOROWITZ et GENTILI 75).

DISCUSSION.

Dans les feuilles de P. tataricum, à côté de la rutine et des acides chlorogéniques, nous constatons la présence de dérivés très stables de flavones que nous n'avons observé dans aucun autre organe de la plante, sauf les cotylédons qui ont le même contenu.

En vue de vérifier que les quatre hétérosides non identifiés (spots A, B, C, D), signalés par TROYER (200)dans P. Fagopyrum étaient les mêmes que ceux de P. tataricum, nous avons préparé des extraits de feuilles cotylédonaires de P. fagopyrum. Après chromatographie en double dimension, nous observons les spots A, B, C, D en même position que nos quatre glycoflavones. L'éluat du spot O se superpose au spot A et il en est de même pour les autres, ainsi : (A) = O; (B) = V; (C) = Ho et (D) = S.

Ainsi, dans ces deux espèces voisines, nous trouvons des substances semblant peu communes. En effet - à notre connaissance - elles n'ont été signalées, les unes ou les autres, libres ou sous forme de dérivés glycosés, que dans : Polygonum orientale, Vitex littoralis, Combretum micranthum, Crataegus oxyacantha, Sarothamnus scoparius, Spartium junceum, Saponaria officinalis, Strirodella oligorhiza, Oxalis acetosella, Adonis vernalis, Acer palmatum, A. cissifolium, Tamarindus indica, et quinze graminées (voir 74, 59, 145, 4, 5, 86, 96).

Une mention spéciale doit être accordée à Acer palmatum où ARITOMI (4) signale, pour la première fois semble-t'il, la présences des mêmes quatre glycoflavones que nous avons nous-même retrouvées groupées dans les feuilles de P. tataricum (et P. fagopyrum).

Le fait que leur identification présente encore de réelles difficultés - notamment par suite de leur résistance à l'hydrolyse acide et des incertitudes qui subsistent sur leur structure fine - justifie sans doute le nombre restreint d'espèces où elles ont été reconnues, et il est probable que leur répartition s'avérera plus large dans les années à venir.

En résumé, dans les feuilles de F. tataricum nous retrouvons la rutine et les acides chlorogénique vrai et néo-chlorogénique. De plus nous avons montré la présence de deux C-glycosides de lutéoline : l'orientine et l'homo orientine, et de deux 8-C-glycosides d'apigénine : la vitexine et la saponarétine.

5) LES FLAVONCIDES DES JEUNES HYPOCOTYLES.

Pour nous permettre d'étudier les modifications produites au cours de la senescence dans la région hypocotylaire, nous avons préparé des extraits de jeunes hypocotyles, récoltés (au moment du repiquage) le 3ème jour après le semis. Ceux-ci seront comparés aux hypocotyles âgés récoltés, le 33ème jour après le repiquage.

Nous donnons dans la figure 28 la carte chromatographique correspondant à de jeunes hypocotyles (3 jours). Elle apparaît extrémement simple : un gros spot de rutine et les deux acides clorogéniques.

L'hydrolyse acide ne donne que de la quercétine et un peu d'acide caféique. La phase d'alcool iso-amylique ne révèle aucune anthocyanidine, ce qui fait la preuve non seulement de l'absence d'anthocyanes mais de celle de leuco anthocyanes.

En résumé, les jeunes hypocotyles ne contiennent que de la rutine, de l'acide chlorogénique vrai et de l'acide néo-chlorogénique.

Figure 26 :

Formule développée de lutéoline, orientine et homo orientine.

Figure 27 :

Formule développée d'apigénine, saponarétine, vitexine I et vitexine II.

Figure 28 :

Plant TEM, jeunes hypocotyles. (Voir légende de la fig. 18).

Figure 29 :

Plant TEM. Cartes chromatographiques, au dessous jeunes hypocotyles; en haut hypocotyles âgés.

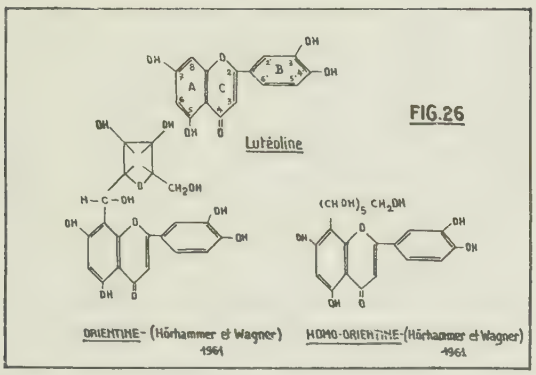


FIG.26

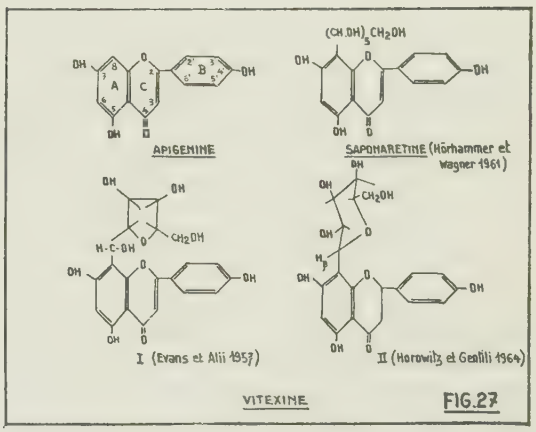


FIG.27

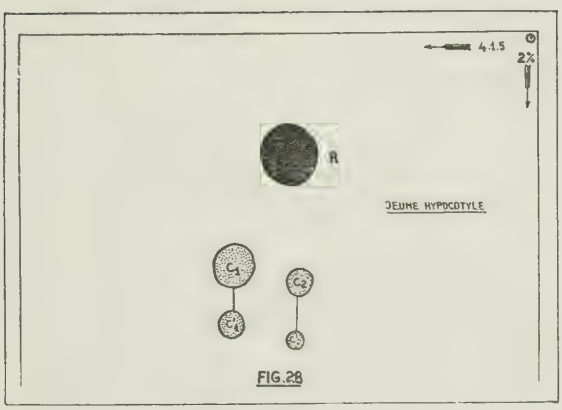


FIG.28

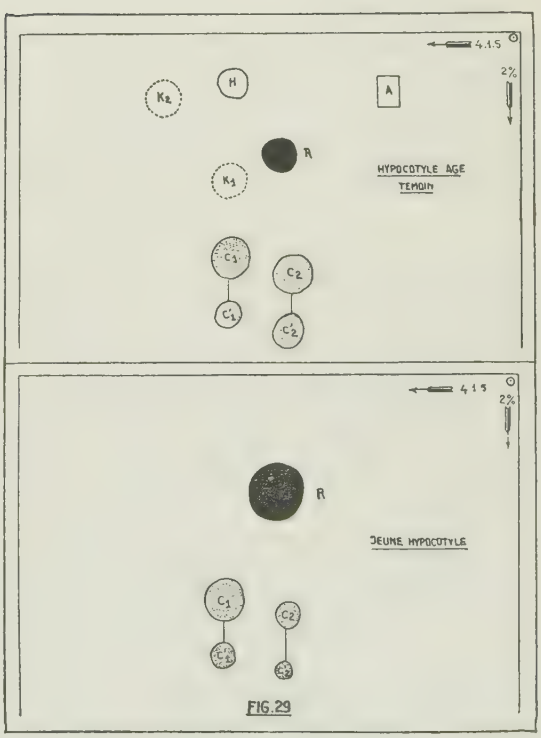


FIG.29

B) REMARQUES SUR LE CONTENU RESPECTIF EN FLAVONOIDES DES HYPOCOTYLES DES TIGES ET DES FEUILLES DE PLANTS

T A C I N S

La première remarque qui s'impose c'est que dans P. tataricum, pour tous les organes et à tous les niveaux, une substance se retrouve d'une manière constante : la rutine, 3-rhamnoglucoside de quercétine. Ce fait était connu et P. tataricum considéré comme une source importante de rutine.

Nos résultats concernant les substances accompagnant la rutine font apparaître un fait important : le contenu en flavonoides est différent entre les tiges et les feuilles d'une part, et quoique à un moindre degré, entre l'hypocotyle et la tige épicotylée, les seuls éléments constants étant la rutine et les acides chlorogénique et néochlorogénique. - Alors que l'hyperine seule accompagne la rutine (et les acides chlorogéniques) sur toute la longueur de la tige épicotylée (fig. 19, 20) elle ne se retrouve pas dans les feuilles où elle est en quelque sorte remplacée par quatre glycoflavones, dont deux dérivent de la lutéoline et deux de l'apigénine (fig. 21).

L'existence d'une disparité dans le contenu en flavonoides et particulièrement en hétérosides de flavones (au sens large) entre les feuilles et les tiges d'une même plante semble être un phénomène général. En effet on l'observe dans tous les cas étudiés : Periploca graeca (109), Polygonum aviculare (197), Passiflora alba (128), P. coerulea (174), P. morifolia, Bryonia dioica (J. TRONCHET 199).

Cependant les différences entre les feuilles et les tiges qui les portent sont rarement aussi marquées que dans le cas de P. tataricum. - Un autre résultat intéressant, et qui à notre connaissance n'a jamais été noté, est l'apparition dans les hypocotyles âgés, de dérivés de kaempferol qu'on ne retrouve ni dans les feuilles ni même dans la tige épicotylée. L'hypocotyle âgé montre ainsi un contenu en flavonoides très différent de celui des entre-noeuds situés immédiatement au-dessus de lui. Cette disparité porte non sur tel ou tel hétéroside de la même aglycone, mais sur l'aglycone elle-même, le kaempferol n'étant pas représenté dans la tige épicotylée, (ni dans les feuilles). Ainsi la région hypocotylaire différant par sa morphologie, sa structure anatomique et même sa croissance de la région épicotylaire, aurait une certaine autonomie biochimique.

Le fait que l'hypocotyle, la tige épicotylée et les feuilles aient un contenu en flavones aussi divers - rutine mise à part - apporte la preuve de l'existence de voies biosynthétiques différentes, et de certaines barrières qui s'opposent aux translocations.

Cependant cette disparité est plus apparente que réelle si l'on considère que la lutéoline et l'apigénine sont les flavones homologues, respectivement, des flavonols quercétine et kaempferol.

C) EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LE CONTENU EN FLAVONOIDES DES HYPOCOTYLES ET DES TIGES DE PLANTS TEMOINS

1) Hypocotyles.

Nous avons groupé dans la figure 29 les cartes chromatographiques correspondant aux hypocotyles jeunes (fig. 28) et aux hypocotyles âgés (fig. 18). Elle fait apparaître les différences suivantes :

1°) le taux de rutine a considérablement diminué,

2°) le double spot d'acide chlorogénique vrai devient dans les hypocotyles âgés plus faible que celui d'acide néo chlorogénique (qui nous sert de spot de référence),

3°) il apparaît un dérivé anthocyanique,

4°) les trois 3-hétérosides de flavonols (hypérine et deux dérivés de kaempferol) absents des jeunes hypocotyles ne se trouvent cependant qu'à l'état de traces.

La présence d'un dérivé anthocyanique dans les régions âgées alors qu'il manque dans les mêmes organes jeunes est un fait couramment observé. Le cas est particulièrement net dans les organes volubiles, tiges ou vrilles (J. TRONCHET 175) où la région apicale circumnutante est totalement dépourvue de pigments anthocyaniques alors même que le reste de la plante apparaît fortement coloré.

La biosynthèse, dans les hypocotyles âgés, et dans ces seuls organes, de dérivés de kaempferol poserait un certain nombre de problèmes. Le fait qu'ils n'existent qu'à l'état de traces peut suggérer qu'on en trouverait de plus fortes quantités soit dans des hypocotyles d'âge intermédiaire, soit dans ces mêmes organes encore plus âgés, après la maturation des graines, alors que la croissance est terminée.

Quant à l'hypérine, sa présence (en faible quantité d'ailleurs) dans les hypocotyles âgés est moins étonnante du fait qu'on la retrouve à tous les niveaux dans la tige épicotylée.

La diminution du taux de rutine au cours du vieillissement nous paraît être un phénomène général, les hétérosides de flavonols tendant à disparaître dans les tiges âgées qu'il s'agisse de tiges volubiles (Periploca graeca 109, 192, Humulus lupulus 195) ou non (Polygonum aviculare 197).

2) Tiges épicotylées.

La confrontation des figures 20 et 19 ne fait apparaître entre les régions jeunes et âgées des mêmes tiges que des différences quantitatives.

Comme dans le cas des hypocotyles, nous observons dans les régions âgées une importante diminution du taux de rutine. Ce fait a déjà été signalé par NOELL (117) pour la même espèce. En revanche le spot d'anthocyane est sensiblement renforcé.

Cette augmentation du taux des pigments anthocyaniques est d'ailleurs visible sur la plante même où les entre-noeuds inférieurs apparaissent beaucoup plus colorés que la région apicale.

Le spot d'hypérine étant très faible, même dans les chromatogrammes correspondant aux régions apicales de tige, il n'est pas possible d'apprécier son éventuelle diminution.

DISCUSSION.

Ainsi, au cours du vieillissement des tiges de P. tataricum nous retrouvons un phénomène analogue à celui observé pour d'autres espèces (109, 192, 195, 197). Cependant, dans le cas de Humulus lupulus et surtout de P. aviculare, la diminution des hétérosides de flavonols s'accompagne de la formation de substances moins complexes, polyphénoliques (par exemple dérivés d'acide gentisique etc...) et de substances coumariniques et il en est de même pour les vrilles de Passifloracées (128), de Légumineuses et de Cucubitacées (J. TRONCHET 199). Rien de tel ne se produit dans la tige des plants témoins de P. tataricum où la sénescence se traduit seulement par la diminution du taux de rutine et l'apparition (ou l'augmentation) des pigments anthocyaniques.

D) DISCUSSION GENERALE SUR LE CONTENU EN FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS

L'étude que nous avons effectuée des divers organes de plants témoins de Polygonum tataricum - eu égard à leur contenu en flavonoides - a permis de mettre en évidence un certain nombre de faits.

Si la présence de rutine dans la plante était connue, nous avons cependant pu préciser qu'elle se retrouve partout, dans la tige comme dans les feuilles, quoique à des taux variables.

En revanche les substances accompagnant la rutine n'avaient pas fait l'objet de recherches systématiques. D'ailleurs les auteurs, ne séparant pas les divers organes, ne pouvaient dresser une carte chromatographique valable. Il est facile d'imaginer la complexité d'un extrait comprenant à la fois feuilles, tiges et hypocotyles.

Nous avons pu montrer également que si l'hypérine, un autre hétéroside de quercétine, est présente, en même temps que la rutine, dans toute la tige (épicotylée et hypocotylée) elle est remplacée dans les feuilles par quatre "glycoflavones" dont deux dérivent de la lutéoline et deux de l'apigénine.

Rappelons que ces glycoflavones, caractéristiques des feuilles de P. tataricum, n'ont été signalées jusqu'à présent ainsi groupées, que dans un nombre très restreint d'espèces.

Un autre résultat concerne une certaine disparité, moins attendue, entre les régions hypocotylaire et épicotylaire des tiges. La présence de dérivés de kaempferol dans le seul hypocotyle semble indiquer une certaine autonomie biochimique de cette région. Nous verrons que, pour certains des plants traités, la barrière hypocotylaire ne se maintient pas.

Il convient de noter également l'extrême simplicité des cartes chromatographiques. En effet, on ne trouve dans les plants témoins, en dehors des dérivés de flavonols ou de flavones, que des acides chlorogéniques et on n'observe jamais, même pour des régions très âgées, de ces substances polyphénoliques à fluorescences bleues ou invisibles en ultraviolet, mais réagissant fortement aux réactifs spécifiques des phénols.

TROISIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS GIBBERELLINES

MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT

A) CONTENU EN FLAVONOIDES DES PLANTS GIBBERELLINES DE POLYGONUM TATARICUM

MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT

Nous venons de voir dans les plants témoins que leur teneur en flavonoides diffère - même par la nature de l'aglycone, entre l'hypocotyle, la tige épicotylée et les feuilles. Pour étudier le réajustement biochimique qui peut éventuellement se produire à la suite du traitement gibberellique, nous allons considérer successivement le contenu en flavonoides des diverses régions de la tige (hypocotyle, région âgée de la tige épicotylée, région apicale) et celui des feuilles.

Rappelons que ce matériel végétal est récolté le 33ème jour après le repiquage, le même jour que pour les plants témoins cultivés en même temps et dans les mêmes conditions de culture.

1) LES FLAVONOIDES DES HYPOCOTYLES AGES GIBB.

Nous représentons dans la figure 30 la carte chromatographique correspondant à l'extrait d'hypocotyles âgés. Nous y reconnaissons un fort spot de rutine R, l'hypérine H, les deux hétérosides de kaempferol K_1 et K_2, les deux acides chlorogéniques et le pigment anthocyanique A. La nature présumée de chaque spot d'hétéroside est vérifiée par superposition d'éluats et hydrolyse des spots isolés.

Une première remarque s'impose, c'est que dans ces chromatogrammes les substances dominantes sont les hétérosides de flavonols. Même K_1 et K_2 donnent des spots bruns, très visibles sans réactifs.

Comparaison avec les hypocotyles âgés témoins.

Dans la figure 18 correspondant aux hypocotyles témoins de même âge, les spots d'hétérosides sont ou très faibles (K_1 et K_2) ou peu importants (H et même R) et le double spot d'acide néo-chlorogénique est dominant.

Dans les hypocotyles de sujets traités à l'A.G. nous venons de voir que les hétérosides de flavonols sont dominants. Notons également que c'est le double spot d'acide chlorogénique vrai qui est plus fort que celui d'acide néochlorogénique et, que le spot A, de nature anthocyanique est un peu plus faible.

Ainsi, sous l'effet d'un traitement gibberellique qui ne les a touchés qu'au moment où ils auraient presque atteint leur taille définitive (pour des témoins) les hypocotyles (âgés) montrent, en même temps qu'un léger accroissement de leur longueur (20 mm), des modifications quantitatives de leur contenu en flavonoides portant sur l'augmentation relative des hétérosides de flavonols.

2) LES FLAVONOIDES DES PORTIONS AGEES DE TIGES GIBB.

La figure 31 donne pour des portions âgées de tiges épicotylées (régions basales situées juste au-dessus de l'hypocotyle) un chromatogramme développé en double dimension dans notre système de solvants habituel.

Nous reconnaissons la rutine (spot R), l'hypérine (H), le pigment anthocyanique (A) et les acides chlorogéniques. Leur identité a été contrôlée par les méthodes habituelles d'élution, hydrolyse des spots etc.).

Comme dans le cas des hypocotyles GIBB, nous notons que les spots d'hétérosides, dans ces régions âgées de la tige, sont encore très marqués.

Comparaison avec les régions âgées de tiges de plants témoins.

La proportion d'hétérosides de quercétine est beaucoup plus élevée que dans les régions homologues de tiges témoins (fig. 19), alors que le spot d'anthocyane est plus faible. Le traitement à l'acide gibberellique tend donc à augmenter la teneur en dérivés de quercétine sans modifier qualitativement ceux-ci.

3) LES FLAVONOIDES DES REGIONS APICALES DE TIGES GIBB.

Le chromatogramme donné dans la figure 32 correspond aux extraits de régions les plus jeunes de plants GIBB âgés de 33 jours.

Les deux spots d'hétérosides de quercétine (R et H) sont très importants et sont accompagnés seulement des acides chlorogéniques déjà signalés dans tous les extraits. L'hydrolyse acide de l'extrait total ne fait apparaître d'ailleurs que de la quercétine et un peu d'acide caféique, et la phase d'alcool iso-amylique reste incolore.

Comparaison avec les régions apicales de plants témoins.

La confrontation des cartes chromatographiques des figures 32 (plant GIBB) et 20 (plant TEM) correspondant à des régions homologues et de même âge fait apparaître d'importantes différences quantitatives et même qualitatives. Si les spots d'hétérosides de quercétine se montrent beaucoup plus larges et denses par rapport aux acides chlorogéniques qui nous servent de référence, nous notons l'absence totale de dérivé anthocyanidique, dans les régions apicales de plants GIBB. D'ailleurs le test à l'alcool iso-amylique est négatif dans ce cas.

4) LES FLAVONOIDES DES FEUILLES DE PLANTS GIBB.

Si nous reconnaissons dans la figure 33 les quatre glycoflavones O, Ho, V et S observées dans les feuilles des plants témoins, elles semblent amoindries tant le spot de rutine est disproportionné. Dans ce chromatogramme en effet, le spot de rutine est si important qu'il déséquilibre en quelque sorte la carte chromatographique.

Figure 30 :

P. tataricum, plant GIBB, hypocotyles âgés. R = rutine; A = anthocyane; H = hypérine : C_1-C'_1 et C_2-C'_2 = acides chlorogéniques; K_1 = 3-rhamnoglucoside de kaempferol; K_2 = 3-mono galactoside de kaempferol.

Figure 31 :

Plant GIBB, portions âgées de tige épicotylée. (Voir légende fig. 30).

Figure 32 :

Plant GIBB, régions apicales de tige. (Voir légende fig. 30).

Figure 33 :

Plants GIBB, feuilles adultes. O = orientine; Ho : homo orientine; V = vitexine; S = saponarétine. (Voir fig. 30).

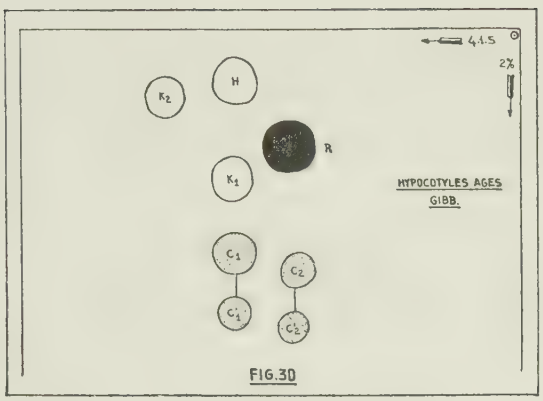


FIG.30

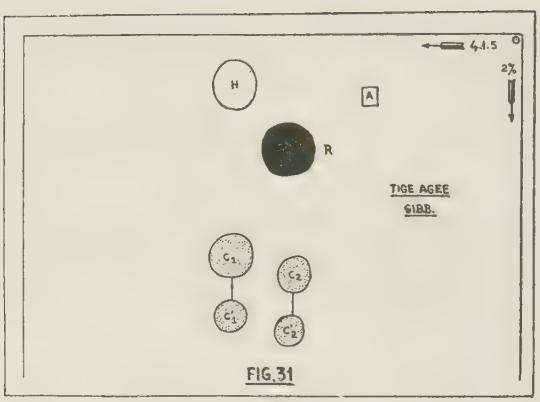


FIG.31

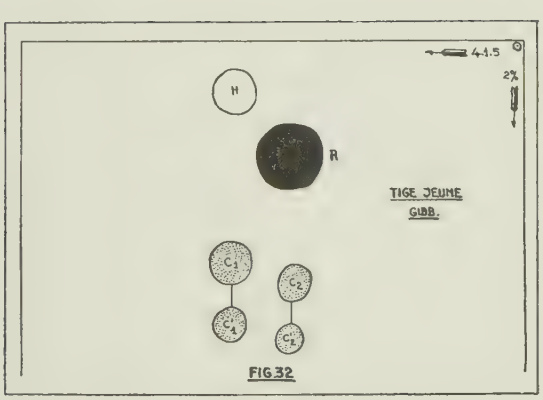


FIG.32

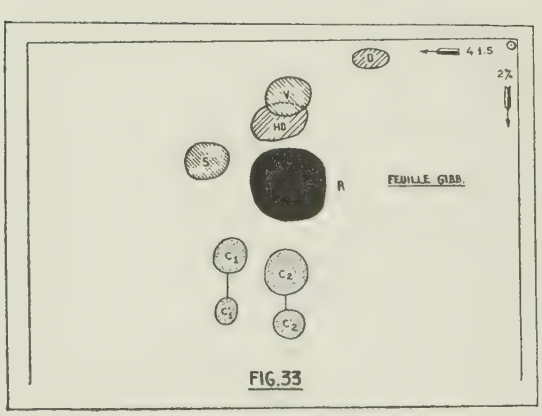


FIG.33

Comme nous le faisons pour chaque nouvel extrait, nous avons vérifié l'identité de tous les spots, et notamment des glycoflavones.

Comparaison avec les feuilles de plants TEM.

Si nous comparons les cartes chromatographiques données dans les figures 21 (feuilles TEM) et 33 (feuilles GIBB), la disproportion du spot de rutine apparaît encore plus nettement. Nous avons pris comme spots de référence le double spot d'acide chlorogénique vrai, l'acide néo-chlorogénique se montrant ici en plus grande quantité.

Dans ce cas encore, le traitement gibberellique a modifié les proportions relatives des diverses substances - en augmentant dans une mesure importante le seul spot d'hétéroside de quercétine - sans entrainer cependant de différences qualitatives.

B) DISCUSSION

Chez Polygonum tataricum le traitement gibberellique a, comme nous l'avons vu plus haut, entraîné une élongation accrue de la tige. L'augmentation du taux de croissance ayant été très précoce, l'hypocotyle lui même a réagi au traitement.

En effet, nous observons pour cette espèce un phénomène assez inhabituel : la croissance de l'hypocotyle a été légèrement accrue sous l'action de l'A G, et sa teneur en flavonoides est également différente.

Donc pour la tige, et à tous les niveaux, de l'hypocotyle à la région apicale, le traitement a induit des modifications dans le contenu biochimique en flavonoides, en augmentant la teneur relative en hétérosides de flavonols, kaempferol et quercétine dans les hypocotyles, et quercétine dans la tige épicotylée.

Les feuilles ont réagi dans le même sens : augmentation considérable du taux de rutine, seul hétéroside de flavonol présent dans cet organe. Les autres hétérosides (glycoflavones) particulièrement stables, restent inchangés.

Ainsi, sous l'action de l'acide gibberellique, les processus biosynthétiques aboutissant à la formation des hétérosides de flavonols ont été renforcés. Ce phénomène a été observé pour de nombreuses espèces contenant de la quercétine (J. TRONCHET 174 à 199) et étudié plus particulièrement pour Convolvulus sepium (177), Lactuca saligna (190), Mercurialis annua (190), Polygonum aviculare (197).

Cependant, dans le cas de C. sepium et P. aviculare, l'augmentation des hétérosides de quercétine est accompagnée de la disparition (ou de la diminution) des substances coumariniques et phénoliques. Rien de tel ne peut se produire dans P. tataricum où le contenu en flavonoides est très simple : hétérosides de flavones ou de flavonols et acides chlorogéniques à l'exclusion de tout dérivé de coumarines ou d'autres substances polyphénoliques.

Dans P. aviculare (et Lactuca saligna) on observe de plus la synthèse d'un nouvel hétéroside de quercétine qu'on ne retrouve dans aucun organe des plants témoins.

Il semble que dans P. tataricum la biosynthèse soit uniquement orientée dans le sens des hétérosides de quercétine et notamment de rutine.

Un point intéressant à signaler qui accuse encore davantage les différences entre plants témoins et gibberellinés, concerne l'absence dans les régions apicales de sujets GIBB, de tout dérivé anthocyanique. Dans ce cas l'étude biochimique confirme un fait aisément observable sur les plants GIBB, dont les sommets de tiges ne présentent pas la même pigmentation que les témoins. A ce sujet, précisons que le test négatif à l'alcool

iso-amylique sur les hydrolysats, est la preuve non seulement de l'absence d'anthocyanes mais également de celle de leuco-anthocyanes.

Si les processus liés au vieillissement se produisent dans le même sens pour les tiges de plants traités GIBB que pour celles des plants TEM : augmentation des anthocyanes et diminution des hétérosides de flavonols, ils apparaissent cependant très fortement ralentis. Nous observons dans les régions âgées de la tige épicotylée des plants GIBB (fig. 31) la même anthocyane (spot de même position chromatographique et de même couleur en lumière visible) que celle existant dès le sommet dans les plants témoins.

Si l'on compare dans les chromatogrammes correspondant respectivement aux régions jeunes et âgées, les spots d'hypérine et de rutine, on observe leur diminution liée au vieillissement. Cependant, même pour ces régions âgées la proportion des hétérosides aux acides chlorogéniques (qui servent de spots de comparaison) est toujours en faveur des dérivés de quercétine. Si nous confrontons à cet égard les figures 19, 20, 31 et 32, nous constatons que c'est avec les régions apicales de tiges témoins (et non aux régions âgées) que peuvent être rapprochées les portions basales de tiges gibberellinées.

Ainsi les phénomènes biochimiques en relation avec la senescence paraissent fortement retardés par le traitement GIBB. Des faits semblables ont été observés pour les tiges de P. aviculare (197).

Un autre point à considérer est l'échec du traitement par l'acide gibberellique concernant l'induction de mouvements révolutifs. En effet nous avons vu plus haut (1° partie) qu'à aucun moment les tiges de P. tataricum ne montrent de mouvements de circumnutation. Ce résultat négatif est à rapprocher d'un cas analogue, celui de Polygonum aviculare. Dans cette espèce comme dans la nôtre, la croissance de la tige est fortement accrue et les flavonoides sont modifiés. Leur réajustement se produit, pour ces deux espèces, dans le sens d'une augmentation des hétérosides de flavonols, mais ne s'accompagne d'aucune tendance à la circumnutation.

Dans le cas de P. aviculare, la non induction de mouvements révolutifs avait été hypothétiquement rapportée (197) à la présence de nombreux dérivés coumariniques etc... qui subsistaient, quoique en bien moindre quantité, dans les sommets de tiges GIBB. Cette explication n'est pas valable pour P. tataricum où, parmi les flavonoides, les substances autres que les flavones et flavonols, sont représentées uniquement par des acides chlorogéniques. Ces derniers ne peuvent être considérés comme des inhibiteurs de mouvements révolutifs puisqu'on les trouve presque constamment - à côté d'hétérosides de quercétine, dans les organes volubiles (J. TRONCHET 174, 176, 179, 184, 186, 191, 192, 195, 199).

L'étude des flavonoides et de leurs modifications à la suite du traitement à l'A G ne nous fournit ainsi aucune explication à ce fait.

Rappelons que, pour notre espèce, et dans nos conditions de culture, le traitement à la gibberelline, s'il n'induit pas de mouvements révolutifs des tiges, n'entraîne pas non plus un taux de croissance anormal d'une région limitée, mais que l'élongation journalière (beaucoup plus élevée que chez les témoins) y est répartie sur une plus grande longueur de la tige.

QUATRIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS TRAITES PAR LA KINETINE

MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT

A) CONTENU EN FLAVONOIDES DE PLANTS DE POLYGONUM TATARICUM TRAITES PAR LA KINETINE

MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT

Comme nous l'avons fait pour les sujets témoins et gibberellinés, nous considérons successivement pour les plants traités KIN le contenu en flavonoides de l'hypocotyle, de la région la plus âgée et de la région apicale de la tige, et des feuilles.

Pour les deux séries traitées à la kinétine (à 50 et 100 ppM) les résultats étant analogues, nous ne rendrons compte que de ceux concernant la série traitée par la solution de kinétine à 100 ppM où ils sont plus marqués. Nous avons préalablement vérifié que le contenu en flavonoides des témoins (graines de 1962) est identique à celui des témoins provenant des graines de 1964, décrit dans la deuxième partie.

1) LES FLAVONOIDES DES HYPOCOTYLES AGES KIN.

La carte chromatographique de la figure 34 - légèrement schématisée - montre une grande complexité.

Si nous retrouvons les deux hétérosides de quercétine (R et H) et les deux hétérosides homologues de kaempferol (K_1 et K_2), les sept substances à fluorescences bleues sont pour la plupart nouvelles. Nous reconnaissons les deux doubles spots des acides chlorogénique vrai et néochlorogénique, à côté des simples spots Sc et Fa, et des trois doubles spots F-F', PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2. Signalons qu'il est très difficile d'obtenir une bonne séparation de ces dernières substances qui apparaissent le plus souvent dans les chromatogrammes étroitement étriquées.

Nous remarquons également deux anthocyanes : A (déjà observée) et A' (nouvelle), qui restent provisoirement indéterminées.

HYDROLYSE DE L'EXTRAIT TOTAL.

La chromatographie de contrôle après hydrolyse de l'extrait total (HCl - 2N, 40 minutes) montre la disparition de tous les spots (excepté des résidus d'acides chlorogéniques) et la formation de sept aglycones dont deux aglycones de flavonols. Celles-ci de mobilité nulle dans les solvants aqueux, restent sur la ligne de départ de 2ème dimension. Il s'agit de quercétine et de kaempferol dont il est facile de vérifier l'identité.

Les autres aglycones, à fluorescences bleues, se groupent dans le quart gauche du chromatogramme par suite de leurs valeurs élevées (et peu différentes) de Rf dans le premier solvant, et comme la plupart d'entre elles donnent des doubles spots en 2ème dimension, elles forment un ensemble pratiquement indéchiffrable.

Nous procédons alors à une chromatographie de ces aglycones dans un système de solvants comportant en lère dimension (au lieu de butanol acétique) le solvant de GRIFFITHS qui donne une bonne séparation des acides phénoliques, et notamment des acides cinnamiques. Nous employons en 2ème dimension le même solvant aqueux, acide acétique à 2%. A l'aide de ces nouvelles chromatographies, nous sommes en mesure de reconnaitre les : acides p-coumarique, férulique et caféique, et une aglycone de coumarine, la scopolétine. Par hydrolyse des spots isolés, nous établirons la corrélation entre chaque aglycone trouvée et le spot qui lui correspond. (L'acide caféique provient de l'hydrolyse partielle des acides chlorogéniques).

Cependant nous nous heurtons à une difficulté particulière du fait de la complexité de la région inférieure des chromatogrammes de l'extrait total qui rend pratiquement impossible la séparation des divers spots. Pour parer à cet inconvénient, nous avons procédé à des élutions successives, suivies de re-chromatographie, d'assez larges portions (comprenant parfois plusieurs spots) de la moitié inférieure de nombreux chromatogrammes. Nous découpons ensuite les spots (pour éluats et hydrolyses) lorsqu'ils apparaissent correctement séparés.

Détermination du spot Sc = scopoline.

Le spot Sc qui apparaît dans les chromatogrammes entre les deux spots trans des acides chlorogéniques, donne en ultra-violet une intense fluorescence bleu violet (tableau VII).

Nous procédons à une hydrolyse acide (HCl 10%, 4 minutes) de nombreux spots isolés. La chromatographie de contrôle montre la disparition du spot Sc et la présence d'une aglycone fluoresçant bleu vif, à grand Rf (0,83) dans le butanol acétique).

Par chromatographie dans le solvant de GRIFFITHS (en lère dimension) nous reconnaissons l'aglycone de coumarine observée dans les hydrolysats de l'extrait total et qui a la position chromatographique de la scopolétine, 7-hydroxy-6-methoxy coumarine (Rf = 0,38; acide p-coumarique (réf.) = 0,40).

Pour vérifier l'identité de cette aglycone, nous comparons ses réactions colorées et ses valeurs de Rf dans divers solvants avec de l'authentique scopolétine (56 bis, 154), isolée d'hydrolysats d'extraits de feuilles de Atropa belladonna. De plus, par la méthode témoin interne, nous nous assurons de sa parfaite superposition dans plusieurs systèmes de solvants, avec la scopolétine pure.

TABLEAU VII

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de Pb	$AlCl_3$ + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de BARTON
Spot SC	Bleu violet	Bleu violet	Bleu	Bleu violet	+	+
Scopoline pure	Bleu violet	Bleu violet	Bleu	Bleu violet	+	+
Spot Fa	Bleu violet	Bleu violet	Bleu	Bleu violet	+	+
Fabiatrine pure	Bleu violet	Bleu violet	Bleu	Bleu violet	+	+
Aglycone Spots Sc et Fa	Bleu	Bleu intense	Bleu	Bleu intense	+	+
Scopolétine pure	Bleu	Bleu intense	Bleu	Bleu intense	+	+

Ainsi le spot Sc est un dérivé de scopolétine. Il a les réactions colorées et les valeurs de Rf (0,52 dans le butanol acétique; 0,84 acide acétique 15%; 0,60 dans l'acide acétique 2%) de la scopoline, 7-glucoxy-6-methoxy coumarine (56 bis, 138).

Nous vérifions par les méthodes habituelles et notamment par co-chromatographie avec de la scopoline pure, isolée d'extraits de feuilles juvéniles de Hedera helix (187) l'identité du spot Sc avec la scopoline.

Détermination de spot Fa = fabiatrine.(?).

Nous procédons pour le spot Fa comme nous l'avons fait pour le spot Sc, à une hydrolyse acide sur un grand nombre de spots découpés dans des chromatogrammes en double dimension. Nous utilisons HCl 10% et maintenons au bain-marie bouillant environ 4 minutes. La chromatographie de contrôle de l'hydrolyse montre la disparition totale de Fa, et la formation d'une aglycone, fluoresçant bleu intense.

Par chromatographie dans le solvant de GRIFFITHS, l'aglycone de Fa se place à la même position que l'aglycone de Sc, ou scopolétine. L'identité de l'aglycone de Fa et de la scopolétine est vérifiée par les méthodes habituelles.

Le spot Fa est donc, comme Sc, un dérivé de scopolétine.

Ses réactions colorées sont celles de la fabiatrine : 7-primevéroside de scopolétine, mais ses valeurs de Rf d'après des éluats si elles sont très proches de celles de la fabiatrine (56 bis), sont également peu différentes de celles d'un autre dérivé osidé de scopolétine trouvé par SARGENT et SKOOG (138), à côté de la scopoline et de la fabiatrine, dans l'écorce de racines de Tabac, et qu'ils ont déterminé comme étant un gentiobioside de scopolétine.

TABLEAU VIII

(D'après SARGENT et SKOOG 138)

	Butanol acétique 4/1/2	Eau	A. acétique 10%
fabiatrine	0,47	0,73	0,78
gentiobioside de scopolétine	0,41	0,75	0,80

Nous disposons de fabiatrine, extraite de feuilles de Atropa belladonna. Cette substance se superpose, à peu près au spot Fa, mais ce dernier étant faible dans nos extraits, nous n'avons pu préparer une quantité suffisante d'éluats pour la co-chromatographie dans plusieurs systèmes de solvants. Le manque de matériel ne nous a pas permis de rechercher les sucres après hydrolyse du spot. D'autre part, les spectres dans l'ultraviolet de la fabiatrine et du gentiobioside de scopolétine donnés par SARGENT et SKOOG sont si voisins qu'ils ne peuvent être utilisés valablement pour une discrimination sûre entre ces deux substances.

Ainsi le spot Fa est un dérivé di-glycosé de scopolétine, mais la nature de ses sucres ne pouvant être précisée, nous ne pouvons conclure avec certitude qu'il s'agit bien de fabiatrine.

ETUDE DES DERIVES D'ACIDES CINNAMIQUES.

L'hydrolyse acide des deux spots Sc et Fa, dérivés glycosés de scopolétine, explique la présence de cette dernière dans les aglycones obtenues par hydrolyse de l'extrait total. Il reste à déterminer les spots qui correspondent aux acides cinnamiques, p-coumarique et férulique.

Les réactions colorées (tableau IX) permettent de séparer en deux groupes nettement distincts les doubles spots de la partie gauche du chromatogramme. En effet, si F-F' donne avec tous les réactifs des fluorescences bleu-vert, les deux doubles spots PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2, fluorescent violet-bleu. Ces réactions sont celles, respectivement, de l'acide férulique et de l'acide p-coumarique.

Détermination du double spot F-F' = acide féroyl-quinique.

La séparation de ce double spot avec le double spot voisin d'acide chlorogénique vrai est particulièrement difficile à obtenir, et, en

fait, nous avons retrouvé dans les chromatographies d'éluats de F-F' une petite quantité de C_1-C'_1.

De grandes précautions doivent être prises pour mettre en évidence l'aglycone du spot F-F' dont nous avons toutes raisons de croire qu'il s'agit d'acide férulique. En effet, cet acide cinnamique est thermolabile, photolabile, et notamment disparaît très vite sur les chromatogrammes exposés à la lumière ultra-violette (communiqué par J. TRONCHET).

TABLEAU IX

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de Plomb	$AlCl_3$ + NH_3	Oxychlorure de Zirconium	Réactif de Benedikt	Réactif de BARTON
Spot F - F'	Bleu	Bleu vert	Bleu	Bleu vert	Bleu vert	+	+
Aglycone Spot F-F'	Bleu	Bleu vert	Bleu	Bleu vert	Bleu vert	+	+
Acide férulique du commerce	Bleu	Bleu vert	Bleu	Bleu vert	Bleu vert	+	+
Spot PC_1-PC'_1	Bleu	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	+	+
Spot PC_2-PC'_2	Bleu	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	+	+
Aglycone des spots PC	Bleu	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	+	+
Acide p. coumarique	Bleu	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	Bleu violet	+	+

Hydrolyse alcaline de F-F'.

Dans ce cas nous préférons procéder à une hydrolyse alcaline qui se fait à la température du laboratoire (NaOH-2N, 4 heures). Après acidification, l'aglycone est extraite d'abord avec une très faible quantité d'acétate d'éthyle (pour éviter de la concentrer) puis chromatographiée immédiatement. Le reste de l'aglycone est extraite ensuite avec une quantité suffisante d'acétate d'éthyle et concentrée et soumise éventuellement à chromatographie.

La chromatographie de contrôle montre la disparition des spots F-F', et l'apparition d'une aglycone, à grand Rf dans le butanol acétique (0,84) qui donne dans le solvant aqueux de 2ème dimension, le double spot caractéristique des acides cinnamiques (0,38 - 0,68) dans l'acide acétique à 2% (214).

Dans le solvant de GRIFFITHS cette aglycone a la même valeur de Rf (0,60) que l'acide férulique (78). Nous vérifions l'identité de l'aglycone de F-F' qui se superpose exactement dans tous les systèmes de solvants utilisés, avec de l'acide férulique du commerce.

Le double spot F-F', dérivé d'acide férulique, peut être soit un depside (acide féroyl-quinique), soit même un ester glycosé. Dans les deux cas, en effet, on observe l'isomérisation trans-cis qui donne le double spot caractéristique de l'aglycone (57), après chromatographie dans un solvant aqueux. HARBORNE et CORNER (57) ne signalent qu'un dérivé glucosé d'acide férulique qu'ils retrouvent dans les pétales de Antirrhinum majus, Petunia hybrida, Brunfelsia calycina et dans les feuilles de Eulalia japonica, Raphanus sativus, et Solanum sp. Cet ester glucosé (FE 1) que nous avons observé dans les extraits de feuilles de Raphanus sativus, a une valeur de Rf dans le butanol acétique (0,57) plus faibles que celles de l'acide chlorogénique vrai (0,59), alors que notre spot F-F', s'il se sépare mal de l'acide chlorogénique a des Rf légèrement supérieurs. Nous n'avons pas tenté de caractériser, après hydrolyse alcaline des spots F-F', l'acide quinique, ce dernier s'y trouvant nécessairement à partir de l'acide chlorogénique élué en même temps.

Nous ne pouvons ainsi apporter la preuve absolue que F-F' soit bien un acide féroyl-quinique mais sa position chromatographique (dans les re-chromatographies d'éluats) est celle de la même substance déterminée dans les flagelles de Humulus lupulus (195). La présence d'acides caffoyl-quiniques (a. chlorogéniques) et d'acides p-coumaryl-quiniques (comme nous le verrons plus loin) rend probable l'existence, dans le même extrait d'un acide féroyl-quinique.

Détermination des doubles spots PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2 = acides para-coumaryl-quiniques.

Nous étudions ensemble ces quatre spots qui présentent avec les divers réactifs (tableau IX) les mêmes teintes de fluorescence dans les bleu-violets, et qui doivent correspondre à la seule aglycone de l'extrait total non retrouvée au cours des hydrolyses partielles des différents spots, l'acide p-coumarique.

Hydrolyse alcaline des quatre spots PC.

Comme pour F-F' nous procédons à une hydrolyse alcaline, et non une hydrolyse acide. L'aglycone présumée, acide p-coumarique, peut être, en effet, partiellement détruite au cours d'une hydrolyse acide.

L'hydrolyse alcaline a été effectuée dans les mêmes conditions que pour F-F'. La chromatographie de contrôle - qui nous permet de vérifier la disparition des quatre spots PC - fait apparaitre une aglycone, à grand Rf dans le butanol acétique (0,88) visible en ultra-violet surtout en présence de vapeurs de NH_3 où elle donne une intense fluorescence violet bleu.

Par chromatographie dans le solvant de GRIFFITHS cette aglycone a la même position que l'acide p-coumarique pur (0,41) et elle donne dans le solvant aqueux de 2ème dimension (acide acétique 2%) le même double spot que ce dernier (0,40 - 0,73). L'identité de l'aglycone des spots PC est confirmée par les méthodes habituelles.

Les quatre spots sont des dérivés d'acide p-coumarique. Depuis 1955 où CARTWRIGHT, ROBERTS et alii (26) ont démontré la présence d'acides p-coumaryl-quiniques dans les feuilles de Thé, de Pommier et de Poirier, les recherches sur divers organes volubiles (tiges ou vrilles ont permis de les retrouver dans plusieurs espèces (Convolvulus sepium 176, Periploca graeca 110, Humulus lupulus 195, Passiflora suberosa 128, etc...).

Les deux acides p-coumaryl-quiniques décrits dans les feuilles de Thé (26) ont exactement le même comportement chromatographique que nos doubles spots PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2 et la superposition des uns et des autres est parfaite dans notre système de solvants habituel. Signalons que les trois depsides d'acides cinnamiques que nous retrouvons ici sont les mêmes que ceux déjà observés dans les tiges jeunes de Humulus (195).

En résumé, les hypocotyles âgés des plants traités par la kinétine contiennent deux 3-hétérosides de quercétine, dont la rutine, les deux 3-hétérosides homologues de kaempférol, deux pigments anthocyaniques, deux acides chlorogéniques, de la scopoline, de la fabiatrine (ou un disaccharide voisin), un acide féroyl-quinique et deux acides p-coumaryl-quiniques.

Comparaison avec les hypocotyles âgés témoins.

Si nous nous reportons à la figure 18, correspondant aux hypocotyles de plants TEM, récoltés le même jour, nous constatons qu'il s'est formé dans les hypocotyles des plants traités (fig. 34) sous l'action de la kinétine, plusieurs spots (assez faibles d'ailleurs) qui manquent totalement dans les témoins. Ces substances sont, soit des dérivés coumariniques (Sc et Fa), soit des depsides d'acides cinnamiques (PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2 et F-F'). De plus nous observons un nouveau spot d'anthocyane (A').

Les modifications quantitatives sont également notables : les spots de 3-hétérosides de flavonols, très denses, sont dominants, alors que, pour les témoins, ce sont les acides chlorogéniques qui apparaissent

Figure 34 :

P. tataricum, plants KIN (100 ppM), hypocotyles âgés. R = rutine; H = hypérine; K_1 = 3-rhamnoglucoside de kaempferol; K_2 = 3- mono galactoside de kaempferol (?); A et A' = pigments anthocyaniques; C_1-C'_1 = acide chlorogénique vrai; C_2-C'_2 = acide néochlorogénique; Sc = scopoline, 7- glucoside de scopolétine; Fa = fabiatrine (?), 7- primevéroside de scopolétine; F-F' = acide féroyl-quinique; PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2 = acides p-coumaryl-quiniques.

Figure 35 :

Plants KIN (100 ppM), régions âgées de la tige épicotylée. (Voir légende fig. 34).

Figure 36 :

Plants KIN (100 ppM), régions apicales de tige. (Voir légende fig. 34).

Figure 37 :

Plants KIN, feuilles adultes. O, Hυ, V et S = traces d'orientine, homo orientine, vitexine et saponarétine (Voir légende fig. 34).

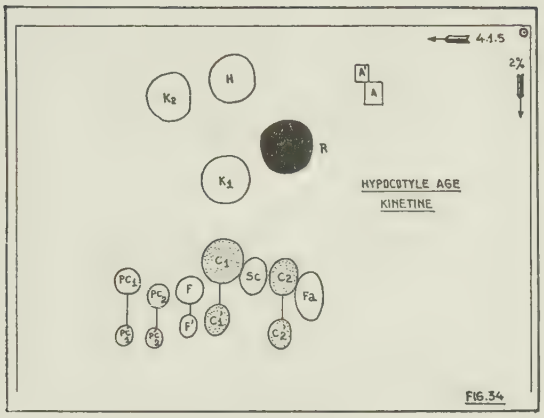


FIG.34

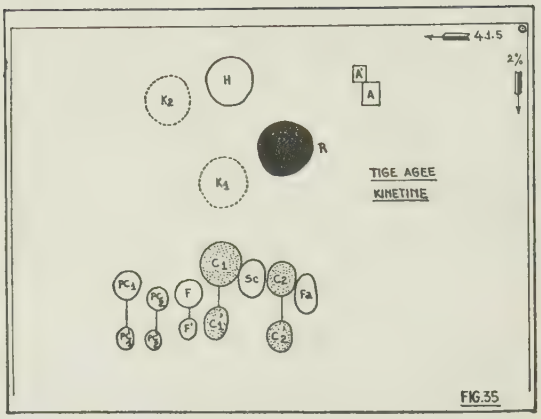


FIG.35

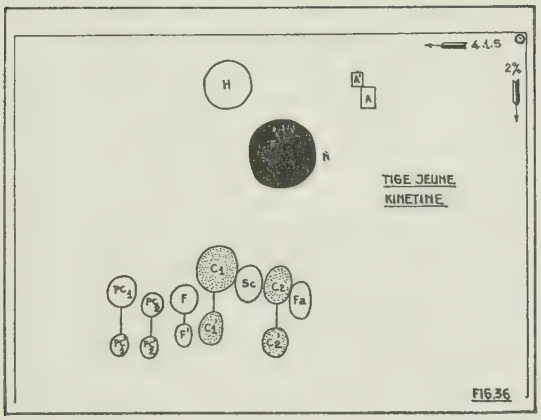


FIG.36

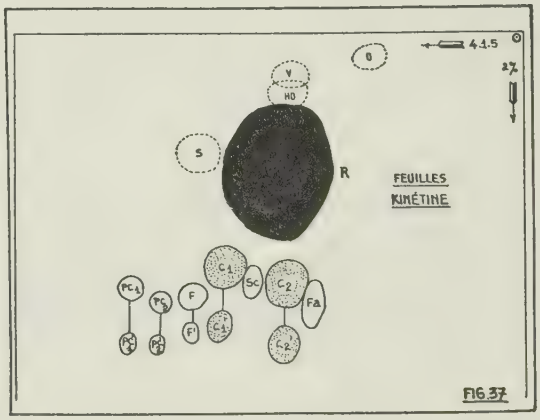


FIG.37

les plus importants. Nous allons voir que ce profond remaniement du contenu en flavonoides n'est pas particulier aux hypocotyles, mais se retrouve dans la tige épicotylée et dans les feuilles.

2) LES FLAVONOIDES DES REGIONS AGEES DE TIGES KIN.

Si nous considérons la figure 35 donnant la carte chromatographique correspondant aux régions âgées de la tige épicotylée, nous observons qu'à ce niveau, le contenu en flavonoides de la tige des plants traités KIN est également profondément modifié, et dans le même sens que dans l'hypocotyle.

Nous retrouvons en effet, le pigment anthocyanique A', les deux dérivés de scopolétine (scopoline et fabiatrine), les depsides d'acides p-coumarique et férulique, à côté des deux acides chlorogéniques habituellement observés.

Quant aux hétérosides de flavonols, ils sont les mêmes que dans l'hypocotyle. Les deux 3-hétérosides de kaempferol sont présents, accompagnant encore à ce niveau la rutine et l'hypérine, dominantes.

Comparaison avec les régions homologues des plants témoins (fig. 19).

Aux très importants changements précédemment étudiés dans les hypocotyles des plants traités KIN (formation de dérivés de coumarines et d'acides cinnamiques) également observés ici, s'ajoute la présence, anormale dans la tige épicotylée, des deux dérivés de kaempferol K_1 et K_2.

Ce fait doit être -hypothétiquement - rapproché de la formation de très longues racines adventives sur les entre-noeuds inférieurs de la tige épicotylée (et des hypocotyles) des plants traités KIN (fig. 9). Rappelons que les hypocotyles des plants TEM forment eux aussi, dans nos conditions de culture, des racines adventives, mais qui restent peu nombreuses et très courtes.

La présence de dérivés de kaempferol, dans les hypocotyles TEM, (en faible quantité), dans les hypocotyles et les régions basales de la tige épicotylée des plants traités KIN, semblerait ainsi corrélative d'une tendance à former des racines adventives, tendance qui se traduirait pour les plants KIN par une prolifération de racines par suite de la vigueur exceptionnelle des sujets.

La kinétine a ainsi modifié à ce niveau les équilibres physiologiques, et induit de profonds bouleversements qui se traduisent à la fois dans le contenu biochimique en flavonoides et dans la morphologie des plants traités.

3) LES FLAVONOIDES DES REGIONS APICALES DE TIGES KIN.

La figure 36 qui correspond aux parties apicales, récemment formées, de tiges de sujets traités KIN, montrent qu'à ce niveau existent déjà les mêmes dérivés de coumarines et d'acides cinnamiques, que nous avons signalés dans les régions âgées de la tige et dans l'hypocotyle. Nous

observons également les deux pigments anthocyaniques. La rutine est ici dominante et l'hypérine donne également un spot très dense. Un point à noter, l'absence des deux dérivés de kaempferol que nous ne retrouvons plus à ce niveau de la tige.

Comparaison avec les régions apicales de plants TEM.

La carte chromatographique de la figure 20 apparaît bien simple, comme schématique, par rapport à celle que nous venons d'étudier : un fort spot de rutine (largement dominante), un peu d'hypérine, un seul pigment anthocyanique et les deux acides chlorogéniques. Dans les plants traités KIN le nombre de substances a plus que doublé, et la carte chromatographique - même pour ces régions très jeunes - apparaît très complexe.

4) LES FLAVONOIDES DES FEUILLES DE PLANTS KIN.

La figure 37 où nous reproduisons un chromatogramme d'extrait de feuilles adultes de plants traités à la kinétine (100 ppM) présente un caractère nettement anormal.

Si nous retrouvons les spots de depsides d'acides cinnamiques et de dérivés de scopolétine en proportion analogue, la rutine donne un spot démesuré, d'ailleurs très dense, qui déséquilibre la carte chromatographique et "retient" les spots V et Ho en deuxième dimension.

Les quatre spots de glycoflavones O, Ho, V et S sont très faibles, à l'état de traces, décelables seulement après application de chlorure d'aluminium.

De plus nous observons, dans le quart gauche inférieur du chromatogramme une large plage, qui n'apparaît fluoresçant violet qu'après le réactif de BENEDIKT, ne donne rien au BARTON (elle n'est donc pas phénolique), ni avec les autres réactifs. Cette plage reste de nature indéterminée.

Comparaison avec les feuilles adultes de plants TEM.

Si nous reprenons la figure 21 qui concerne les feuilles de plants témoins, pour la confronter avec la carte chromatographique que nous venons de présenter (fig. 37), nous constatons qu'elle se montre si différente qu'il est difficile de concevoir qu'il puisse s'agir effectivement du même organe de plants de même âge.

Nous avons vu (fig. 8) que l'effet du traitement KIN sur la morphologie se traduit notamment par un accroissement très marqué (plus de trois fois) de la surface foliaire de chaque feuille. Ce phénomène s'accompagne ainsi d'un profond remaniement des flavonoides, consistant d'une part dans la formation (en petite quantité) de dérivés de coumarines et d'acides cinnamiques, et d'autre part - et cette réaction est particulière à la feuille - en une augmentation considérable du taux de rutine. Notons également la diminution des spots de glycoflavones qui sont réduites à l'état de traces.

B) EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LE CONTENU EN FLAVONOIDES DES TIGES KIN

Comme nous l'avons fait pour les plants TEM et GIBB nous comparons aux régions âgées de la tige, les régions apicales jeunes pour évaluer les effets du vieillissement sur la teneur en flavonoides.

Dans le cas des plants traités KIN nous n'observons que très peu de modifications : les substances dérivées de coumarines ou d'acides cinnamiques - spéciales aux sujets KIN - ont une égale répartition dans les deux cartes chromatographiques, les deux pigments anthocyaniques y sont sensiblement de même force. Seule la rutine marque une diminution notable, l'hypérine donne, dans les deux cas des spots équivalents.

Quant aux spots d'hétérosides de kaempferol, leur présence insolite dans les portions basales de la tige épicotylée, vraisemblablement symptôme de bouleversements physiologiques, est difficilement interprétable. Le fait qu'il n'en existe pas dans les régions apicales ne peut être relié, dans un sens ou dans l'autre, à des processus de vieillissement.

La sénescence se traduit, pour les plants traités à la kinétine, par très peu de changements dans les flavonoides : léger amoindrissement du spot de rutine. Il y a donc ralentissement de la sénescence, comme pour les plants GIBB, mais le phénomène est encore plus marqué.

Rappelons ici que les plants traités à la kinétine, beaucoup plus robustes, sont encore en pleine croissance à l'époque de la récolte du matériel végétal (35ème jour après le repiquage). Ce fait explique sans doute que les symptômes de vieillissement - eu égard aux flavonoides - soient beaucoup moins marqués que pour les témoins, les régions homologues de même âge formel n'ayant pas le même âge physiologique pour les deux séries (TEM et KIN).

C) DISCUSSION

L'étude du contenu biochimique en flavonoides des plants de P. tataricum traités par la kinétine (100 ppM) nous a permis de mettre en évidence de très importants changements tant qualitatifs que quantitatifs, qui accompagnent ainsi les modifications morphologiques très visibles concernant aussi bien la hauteur de la tige ou la taille des feuilles que la formation de racines adventives.

En effet, pour les deux séries (kinétine à 50 ou à 100 ppM) nous observons une augmentation du taux journalier d'élongation (fig. 11 et 12) et un accroissement très marqué de la vigueur des sujets. Signalons que pour la série KIN à 50 ppM, pour laquelle nous n'avons pas rendu compte des résultats concernant la biochimie, les modifications sont analogues à celles décrites pour la série KIN à 100 ppM, mais un peu atténuées.

Modifications qualitatives.

- L'apparition de nouvelles substances à la suite du traitement KIN se produit dans la plante entière, tige à tous les niveaux et feuilles même pour l'hypocotyle qui, ayant presque atteint sa taille définitive au début du traitement, ne montre aucune croissance supplémentaire.
- Qu'il s'agisse de l'hypocotyle, de la tige épicotylée (jeune ou âgée) ou des feuilles, les substances néoformées sont les mêmes.

Si les depsides d'acides p-coumarique et férulique sont observés dans les organes ("flagelles" de tiges volubiles ou vrilles 110, 176, 191, 192, 195) siège d'une croissance intense, en revanche les dérivés coumariniques sont considérés comme inhibiteurs (42, 43, 64). Cependant dans nos extraits, les dérivés de scopolétine n'existent qu'en petite quantité (les spots Sc et Fa sont faibles) et il a été signalé qu'à très faibles doses les coumarines cessent d'être inhibitrices (LIBBERT 97, 98, 99 et 88, 159).

L'étude biochimique des plants témoins nous a permis de dresser des cartes chromatographiques très simples, comme schématiques (rutine et acides chlorogéniques fig. 28; hypérine, rutine, acides chlorogéniques fig. 20 etc...) d'où sont absents les spots à fluorescence bleue (dérivés polyphénoliques ou coumariniques) observés presque constamment dans les organes homologues d'autres espèces. Donnons comme exemple, en nous restreignant au genre Polygonum :

- feuilles de P. cuspidatum. On trouve (78) des dérivés des acides caféique, protocatéchique, gentisique, p-hydroxybenzoique, p-coumarique, férulique, sinapique et vanillique.
- tiges de P. baldschuanicum. On observe notamment de l'acide gallique libre et de l'acide galloyl-quinique (198).
- tiges et feuilles de P. aviculare. Dans cette espèce on a montré (197) la présence, dominante dans les régions âgées, de très nombreux dérivés polyphénoliques.

Pour ces trois espèces de Polygonum, de port très différent : dressé (P. cuspidatum), volubile (P. baldschuanicum) semi-rampant (P. aviculare) contenant par ailleurs des hétérosides de quercétine, la carte chromatographique paraît très encombrée à côté de celles données par P. tataricum pour les plants témoins.

La synthèse de ces substances à fluorescence bleue - même sous l'effet d'un traitement chimique - est tout à fait remarquable pour cette espèce qui normalement ne montre aucune tendance à former des dérivés polyphénoliques etc...

Une autre modification qualitative concerne l'apparition, à un niveau plus élevé de la tige, d'hétérosides de kaempferol qui, normalement, restent localisés dans l'hypocotyle. Nous avons - par hypothèse - relié ce fait (présence de kaempferol) à une potentialité particulière, déjà observée dans les hypocotyles témoins mais peu marquée, et qui se traduit dans les plants KIN beaucoup plus robustes, par la formation de nombreuses et longues racines adventives.

Nous notons également que dans les plants KIN il apparaît dans la tige, à tous les niveaux, un second pigment anthocyanique A' qu'on observe jamais chez les témoins.

Modifications quantitatives.

On constate partout dans les plants KIN une augmentation des flavonols : quercétine et kaempferol dans les hypocotyles et la région basale de la tige épicotylée, quercétine dans les parties jeunes de la tige et surtout dans la feuille. Nous avons vu que dans ce dernier cas (fig. 37) l'accroissement du taux de rutine est considérable et bouleverse la carte chromatographique. Ce fait nous parait être l'indice d'un profond déséquilibre physiologique. Cependant l'aspect des plants KIN, beaucoup plus robustes que les témoins, n'évoque pas un état pathologique.

Des recherches de physiologie végétale concernant l'action synergique de divers flavonoides et de l'acide indol acétique (TOMASZEWSKI 159) nous ne retenons que les résultats concernant la rutine. Cet hétéroside de quercétine, employé à la concentration de 5 x 10 - 6 M, inhibe la destruction de l'acide indole acétique par l'auxine-oxydase dans le cas du coléoptile d'Avoine. La rutine aurait donc un effet favorable sur la croissance.

Dans le cas de plants KIN de P. tataricum où la rutine n'est pas ajoutée, mais où elle s'est synthétisée en plus grande quantité, le problème nous semble très difficile à poser.

Dans les feuilles des plants KIN nous observons la presque totale disparition des quatre spots de glycoflavones, caractéristiques des feuilles de P. tataricum (comme de P. fagopyrum). Ces spots sont si faibles qu'ils ne sont visibles qu'après pulvérisation de réactifs tel que le chlorure d'aluminium.

Ce fait pourrait avoir un intérêt pratique pour l'industrie pharmaceutique. Dans les sujets KIN le rendement en rutine est très fortement augmenté : la teneur en est plus élevée et la masse totale des plants (et notamment des feuilles, les plus riches en rutine) est beaucoup plus importante. De plus l'extraction en serait sans doute facilitée par la disparition presque totale des hétérosides (glycoflavones) accompagnant la rutine dans les feuilles.

CINQUIEME PARTIE

CONTENU BIOCHIMIQUE EN FLAVONOIDES DES PLANTS TRAITES PAR LA COUMARINE

MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT

A) CONTENU EN FLAVONOIDES DES PLANTS DE POLYGONUM TATARICUM TRAITES PAR LA COUMARINE A 100 ppM

MODIFICATIONS DUES AU TRAITEMENT

Les sujets traités à la coumarine, et notamment avec la solution forte (100 ppM) restent très courts (35 cm) et leurs feuilles sont très réduites (fig. 13). Ils ne nous ont fourni qu'une faible quantité d'extraits, souvent insuffisante pour l'étude des nouveaux spots apparus, eux mêmes assez faibles.

Comme dans les cas précédents, nous allons considérer le contenu en flavonoides d'abord de l'hypocotyle puis, pour la tige épicotylée, de la région âgée et de la partie apicale et enfin des feuilles. Rappelons que la récolte du matériel végétal en vue de la préparation des extraits a été faite le 35ème jour après le repiquage.

1) LES FLAVONOIDES DES HYPOCOTYLES AGES CMA.

La carte chromatographique de la figure 38 correspondant aux hypocotyles âgés des plants traités par la coumarine à 100 ppM, nous permet de retrouver un bon nombre de spots déjà connus, auxquels s'ajoutent des nouveaux spots et notamment P et G. L'ensemble est complexe, et un certain nombre de substances se séparant mal les unes des autres, nous avons établi cette carte chromatographique en nous aidant des résultats obtenus pour les extraits KIN dont nous disposions de plus grandes quantités.

Nous observons la rutine R, l'hypérine H et les deux 3-hétérosides homologues de kaempferol K_1 et K_2 et les acides chlorogéniques, substances caractéristiques des hypocotyles âgés (TEM). Les anthocyanes sont représentées par deux pigments A et A'.

Les substances à fluorescences bleues sont très nombreuses mais elles ne forment en général que des spots faibles. C'est le cas notamment des depsides d'acides p-coumarique (PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2) et d'acide férulique (F-F'), des deux dérivés de scopolétine (Sc) scopoline, (très faible) et Fa, fabiatrine (?), que nous avons déjà identifiés dans les extraits de plants KIN. Les divers éluats, préparés avec ces derniers extraits se superposent sur les spots correspondants des extraits CMA, dont ils présentent les réactions colorées (tableaux VII et IX).

Un certain nombre de spots nouveaux apparaissent. Ce sont des substances à fluorescences bleu-violet. En plus des spots (dominants) P et G, nous observons les spots 1, 2, 3, 4 qui ne sont décelables qu'avec le réactif de BENEDIKT. Ils sont mal délimités, et très faibles, ils ne donnent aucune réaction au réactif de BARTON.

Hydrolyse acide de l'extrait total.

Nous avons procédé à une hydrolyse de cet extrait (HCl-2N, 40 minutes). La chromatographie de contrôle, dans notre système de solvants

habituel, montre la disparition de tous les spots (sauf des acides chlorogéniques) et la formation d'aglycones. Parmi celles-ci, nous reconnaissons la quercétine et le kaempferol (à fluorescence jaune) qui restent sur la ligne de départ de 2ème dimension, les autres aglycones, à fluorescences bleues ou bleu-violet, se groupent dans le quart gauche du chromatogramme (par suite de leurs valeurs élevées de Rf dans le butanol acétique).

Par chromatographie dans le système de solvants comprenant le solvant de GRIFFITHS en lère dimension et l'acide acétique 2% nous sommes en mesure de reconnaitre : l'acide p-coumarique, l'acide férulique, l'acide caféique qui donnent les doubles spots caractéristiques. Nous retrouvons également l'aglycone de coumarine la scopolétine. Nous observons de plus, de l'esculétine (très faible, et qui peut provenir de l'acide caféique par un artefact de chromatographie), de l'acide o-coumarique, et des autres spots fluorescant respectivement bleu clair et bleu violet que nous pensons être de l'acide gentisique et une autre aglycone de coumarine, l'ombelliférone.

Nous allons procéder à des hydrolyses séparément pour chaque spot afin de reconnaitre à quelle aglycone ils se rapportent.

Détermination du spot P = dérivé d'acide p-coumarique.

Ce spot, le seul qui soit visible en lumière de Wood sans réactif donne une intense fluorescence violette. Ses réactions colorées sont celles de l'acide p-coumarique et de ses dérivés (tableau IX). La présence, dans le même extrait, de depsides de cet acide cinnamique rend vraisemblable l'existence d'un autre dérivé, mais nous n'avons trouvé dans la littérature (57) aucune référence pouvant correspondre au spot P qui reste partiellement indéterminé. Nous n'avons pu procéder à l'hydrolyse de ce seul spot, mais nous l'avons soumis à l'hydrolyse en même temps que les spots PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2 et dans ce cas la seule aglycone obtenue est l'acide p-coumarique. Il paraît certain que le spot P soit également un dérivé glycosé d'acide p-coumarique.

Détermination du spot G = dérivé d'acide gentisique.

Le spot G, à fluorescence bleu-violet (tableau X) apparaît pour la première fois dans nos extraits. Nous procédons à une hydrolyse acide (HCl 10%, 4 minutes) pour identifier son aglycone. La chromatographie de contrôle montre la disparition du spot G et la présence d'une aglycone, réagissant fortement au BARTON, à fluorescence bleue, et à grand Rf (0,80) dans le butanol acétique. Nous la chromatographions dans le solvant de GRIFFITHS (en lère dimension) puis dans l'acide acétique à 2% en ajoutant au spot de départ, comme substance de référence, de l'acide p-coumarique.

La position chromatographique de cette aglycone dans ce système de solvants est celle de l'acide gentisique, 2-5, dihydroxy benzoique. Sa valeur de Rf dans le benzène acétique est 0,15 (acide p-coumarique 0,40) et dans le 2% 0,64 (acide p-coumarique 0,40 et 0,73). Ses réactions colorées correspondent à celles de l'acide gentisique et notamment avec une solution d'ammoniaque où elle donne une fluorescence jaune caractéristique

(49). Nous avons obtenu sa superposition à de l'acide gentisique, dans le système de solvants précédent, mais le manque de substance nous a empêché de vérifier dans d'autres systèmes.

Ce spot G, dérivé d'acide gentisique, a la même position chromatographique (Rf butanol acétique : 0,44, 2% : 0,74) que celle d'un dérivé du même acide phénolique signalé dans les tiges âgées de P. aviculare (197). Il s'agit selon toute probabilité de la même substance.

TABLEAU X

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de BARTON	$FeCl_3$ 1%	NH_4OH (solution)	$AlCl_3$ + NH_3	Acétate Basique de Plomb
Spot G	Bleu	Bleu	+	+ +			Bleu	Bleu
Aglycone Spot G	Bleu	Bleu vert	+	+ +	Bleu violet	Jaune	Bleu	Bleu violet
Acide gentisique	Bleu	Bleu vert	+	+ +	Bleu violet	Jaune	Bleu	Bleu violet

Nous avons ainsi pu établir la correspondance entre les aglycones de l'extrait total (acides caféique, férulique, p-coumarique, gentisique et scopolétine) sauf pour l'acide o-coumarique et l'ombelliférone.

L'existence d'acide o-coumarique dans l'hydrolysat de l'extrait total peut être expliquée par la présence dans cet extrait de petites quantités de coumarine incomplètement éliminées par le lavage des plants traités CMA. Cependant il n'est pas exclu que l'acide o-coumarique provienne de l'hydrolyse d'un ester glucosé. La fluorescence bleu-violet des spots encore indéterminés (1, 2, 3 et 4) ne correspond nullement à celle des esters glucosés d'acide o-coumarique (décrits par HARBORNE et CORNER 59) qui fluorescent jaune. Nous avons appliqué sur les chromatogrammes d'extrait total le réactif (NaOH - 2N) qui permet le mieux de révéler de petites quantités de coumarine libre (invisible en ultra-violet). Nous n'avons jamais observé la fluorescence jaune sur les chromatogrammes là où aurait dû se placer la coumarine si elle était présente. Le problème de l'acide o-coumarique dans l'hydrolysat total n'est donc pas résolu.

La dernière aglycone, à fluorescence bleue, donne un seul spot en 2ème dimension. Sa valeur de Rf dans le butanol acétique est très élevée (0,90). Dans le système de solvants comprenant en 1ère dimension le benzène acétique de GRIFFITHS elle se place à la position chromatographique de l'ombelliférone, 7-hydroxy coumarine (Rf benzène acétique : 0,33 et acide acétique 2% : 0,48) dont elle a par ailleurs les réactions colorées (J. TRONCHET 185). L'ombelliférone pourrait provenir des spots 1, 2, 3, 4, indéterminés, dont nous n'avons pu réussir l'hydrolyse.

En résumé, dans les hypocotyles âgés de P. tataricum CMA nous trouvons deux 3-hétérosides de quercétine, deux 3-hétérosides homologues de kaempferol, deux pigments anthocyaniques, deux acides chlorogéniques, deux depsides d'acide p-coumarique, un depside d'acide férulique, deux dérivés de scopolétine, un dérivé d'acide p-coumarique et un d'acide gentisique. De plus nous avons dans les aglycones de l'ombelliférone et de l'acide o-coumarique auxquels nous ne pouvons faire correspondre de spots.

Comparaison avec les hypocotyles âgés TEM.

Si nous nous reportons à la figure 18 correspondant aux hypocotyles témoins de même âge, nous notons de très importantes différences. Les hétérosides de quercétine et de kaempferol restent les mêmes, et en même quantité (par rapport au double spot d'acide néo-chlorogénique pris comme référence) mais nous constatons de nombreux spots nouveaux, fluoresçant bleu ou bleu-violet, qui donnent une carte chromatographique de beaucoup plus complexe que celle des témoins.

Parmi les nouvelles substances, les deux quantitativement plus importantes sont P (sans doute ester glycosé d'acide p-coumarique) et G (dérivé d'acide gentisique). Les depsides d'acides p-coumarique et férulique, ainsi que les dérivés de scopolétine ne donnent que des spots assez faibles. Il en est de même des substances indéterminées (dérivés d'ombelliférone ?), 1, 2, 3 et 4.

Il est intéressant de noter la présence de deux anthocyanes qui donnent deux forts spots contigus. Le pigment anthocyanique nouveau A' a la même teinte en lumière visible que le spot A des hypocotyles TEM. Il dérive vraisemblablement de la même aglycone.

2) LES FLAVONOIDES DES REGIONS AGEES DE TIGES CMA.

Dans la figure 39, le chromatogramme correspondant aux entre-noeuds inférieurs de la tige épicotylée, montre comme spots dominants le spot P et ceux d'acides chlorogéniques. La rutine et l'hypérine sont d'égale force. Les 3-hétérosides de kaempferol ne sont présents qu'à l'état de traces, révélables par le chlorure d'aluminium. Nous retrouvons les deux pigments anthocyaniques A et A'. Les autres spots de dérivés d'acides p-coumarique, férulique et gentisique, et de scopolétine sont faibles. Cette carte chromatographique ne fait apparaître que des différences quantitatives avec la précédente concernant la région hypocotylaire des mêmes plants.

Comparaison avec les régions homologues des plants TEM.

Comme dans le cas précédent, la carte chromatographique des plants CMA accuse une très grande complexité par rapport à celle des témoins. (fig. 19). Qu'il s'agisse des anthocyanes (spot supplémentaire A'), des flavonols (spot K_1 et K_2) ou des substances phénoliques à fluorescences bleues (spots PC_1-PC'_1, PC_2-PC'_2, F-F', Sc, Fa, G et surtout P, spots 1, 2, 3 et 4) nous observons un grand nombre de spots nouveaux qui modifient totalement l'aspect du chromatogramme.

Le fait que les hétérosides de kaempferol se retrouvent à ce niveau montre que les hypocotyles des plants CMA ne gardent pas leur autonomie biochimique comme les hypocotyles témoins.

Signalons que dans les plants témoins, l'hypérine ne se trouve qu'à l'état de traces, alors que dans les plants CMA elle forme un spot de force égale à celui de rutine. Celle-ci semble ainsi avoir perdu sa prédominance sur les autres hétérosides.

3) LES FLAVONOIDES DES REGIONS APICALES DE TIGES CMA.

Pour ces plants traités avec la solution de coumarine à 100 ppM la région apicale de la tige n'est pas une zône de croissance comme c'était le cas pour les plants témoins, et plus encore pour les plants GIBB ou KIN. Le taux journalier d'élongation, très faible dès le début du traitement (fig. 16) a diminué constamment et, au 35ème jour, moment de la récolte, était pratiquement nul.

La figure 40, correspondant à ces régions apicales, ne montre que peu de différence avec la figure précédente. Notons la disparition des hétérosides de kaempferol et du spot G. Les deux spots dominants sont la rutine et le spot P, dérivé d'acide p-coumarique.

Comparaison avec les régions apicales de plants TEM.

La confrontation des figures 20 (TEM) et 40 (CMA) fait apparaître entre les parties apicales des plants témoins et des plants traités par la coumarine les différences déjà observées plus haut entre régions homologues des deux séries : plus grande complexité de la carte chromatographique, formation de nombreuses substances phénoliques à fluorescences bleues, présence d'un second pigment anthocyanique. Si nous considérons les substances communes aux deux extraits, nous constatons que l'hypérine H s'y trouve en plus grande quantité.

Figure 38 :

P. tataricum, plants CMA (100 ppM), hypocotyles âgés. R = rutine; H = hypérine; K_1 = 3-rhamnoglucoside de kaempferol; K_2 = 3-mono galactoside (?) de kaempferol; A et A' = pigments anthocyaniques; C_1-C'_1 = acide chlorogénique vrai; C_2-C'_2 = acide néo-chlorogénique; P = dérivé d'acide p-coumarique; G = dérivé d'acide gentisique; PC_1-PC'_1 et PC_2-PC'_2 = acides p-coumaryl-quiniques; F-F' = acide féruyl-quinique; Sc = scopoline; Fa = fabiatrine (?); spots 1, 2, 3 et 4, indéterminés.

Figure 39 :

Plants CMA, régions âgées de tige épicotylée. (Voir légende fig. 38).

Figure 40 :

Plants CMA, régions apicales de tiges (Voir légende fig. 38).

Figure 41 :

Plants CMA, feuilles adultes. O = orientine; Ho = homo orientine; V = vitexine; S = saponarétine; E = dérivé d'esculétine. (Voir légende fig. 38).

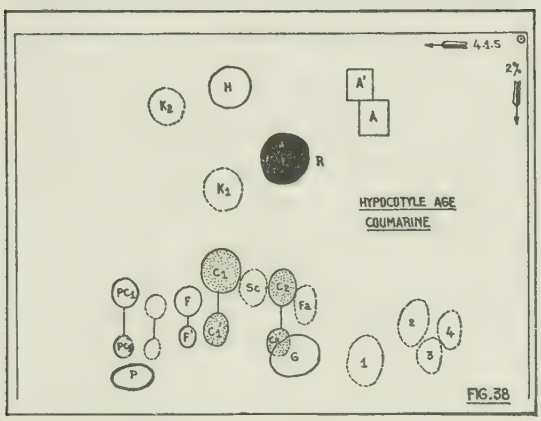


FIG.38

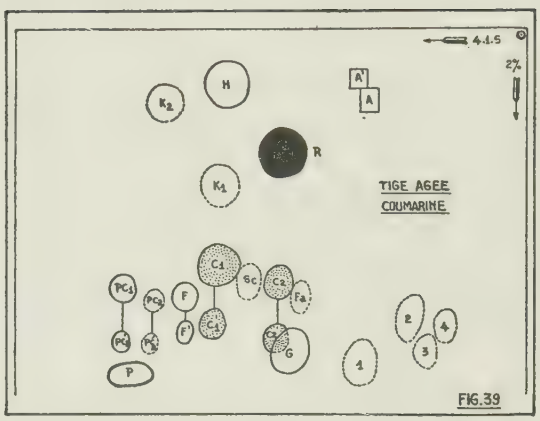


FIG.39

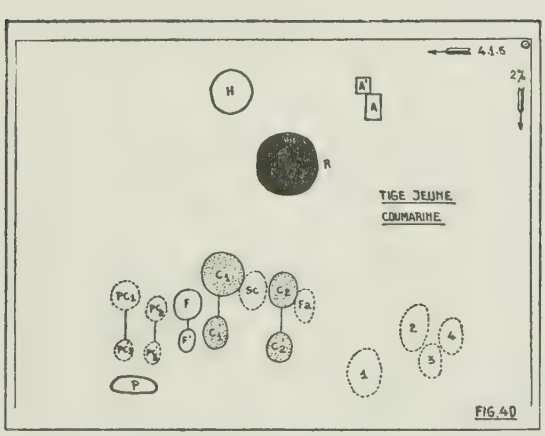


FIG.40

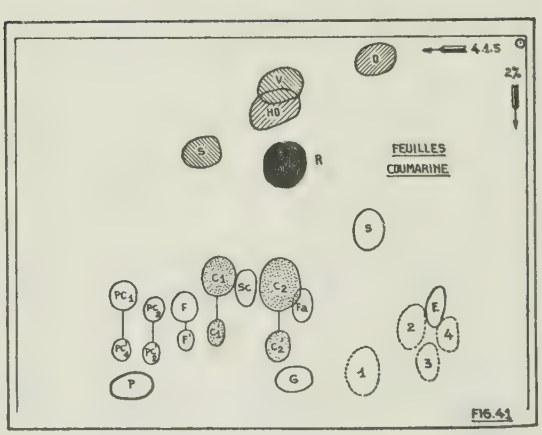


FIG.41

4) LES FLAVONOIDES DES FEUILLES DE PLANTS CMA.

Nous avons étudié également des extraits de feuilles de plants de P. tataricum traités par la coumarine (100 ppM). Dans cette série, les limbes restent petits et leurs bords enroulés en dessous, leur donnent un aspect maladif.

Dans la figure 41, la carte chromatographique qui correspond à ces feuilles, montre les spots d'hétérosides caractéristiques des feuilles : les quatre glycoflavones O, Ho, V et S et la rutine, dominante. Parmi les spots à fluorescences bleues P (dérivé d'acide p-coumarique) et C_2-C'_2 (acide néo-chlorogénique) sont les plus importants. Nous retrouvons également les depsides d'acides cinnamiques et les deux coumarines Sc et Fa, le spot G (dérivé d'acide gentisique, faible) ainsi que les spots indéterminés 1, 2, 3 et 4.

Deux spots nouveaux apparaissent : E, très fortement fluorescent bleu clair, et 5, invisible en ultra-violet et qui donne une forte réaction au BARTON.

Dans l'hydrolysat de l'extrait total, nous retrouvons les mêmes aglycones obtenues dans le cas des hypocotyles âgés CMA (les glycoflavones ne donnant rien à l'hydrolyse acide) soit : acides caféique, p-coumarique, o-coumarique, férulique, gentisique (plus faible), les coumarines scopolétine, ombelliférone et esculétine.

Détermination du spot E = dérivé d'esculétine.

Pour ce spot nouveau, contigu aux spots 2 et 4, nous procédons à l'hydrolyse acide (HCl 10%, 5 minutes). Celle-ci entraîne sa disparition, vérifiée par chromatographie de contrôle et la formation d'une aglycone, fluoresçant bleu clair (tableau XI), et ne donnant qu'un seul spot dans le solvant aqueux de 2ème dimension (Rf : 0,34).

Chromatographiée dans le système de solvants comprenant le benzène acétique en 1ère dimension, l'aglycone du spot E a les mêmes valeurs de Rf que l'esculétine, 6-7, di hydroxy coumarine.

Nous vérifions l'identité de l'aglycone de E et de l'esculétine pure, par la méthode du témoin interne dans plusieurs systèmes de solvants.

Lors de l'hydrolyse acide de l'extrait total de feuilles (comme pour les hypocotyles âgés CMA) nous avons obtenu de l'esculétine. Ce fait ne pouvait être considéré comme une preuve absolue de la présence dans les extraits, d'un dérivé de cette coumarine. En effet, au cours de la chromatographie, on observe constamment, et cela a été signalé (23) la conversion d'une partie de l'acide caféique en esculétine. L'esculétine présente aurait pu provenir, par un artefact de chromatographie, de l'acide caféique de notre hydrolysat. Ce n'est pas le cas ici où nous avons identifié le spot E comme dérivé d'esculétine mais cette explication est sans doute valable pour les hypocotyles CMA où nous n'observons pas de spots donnant les réactions colorées de dérivés d'esculétine (tableau XI).

TABLEAU XI

SUBSTANCE	U.V.	U.V. + NH_3	Acétate Basique de Pb	$AlCl_3$ + NH_3	Réactif de Benedikt	Réactif de BARTON
Spot E	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	-	-
Aglycone Spot E	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	-	-
Esculétine	Bleu	Bleu	Bleu	Bleu	-	-

Ainsi dans les feuilles de plants traités CMA nous voyons apparaître une nouvelle aglycone de coumarine, l'esculétine. Nous n'avons trouvé dans la littérature aucun dérivé d'esculétine dont les valeurs de Rf correspondent au spot E.

Comparaison avec les feuilles de plants TEM.

Les différences observées pour l'hypocotyle et la tige épicotylée entre plants TEM et plants CMA se retrouvent dans le cas des feuilles. Si nous reprenons la figure 21 (TEM) pour la comparer à la carte chromatographique que nous venons de décrire (fig. 41) nous constatons que les changements, portent, là encore, sur la présence d'un grand nombre de substances à fluorescences bleues, les dérivés de flavones et flavonols étant les mêmes et en même proportion.

Les nouvelles substances sont des dérivés d'acides cinnamiques (p-coumarique et férulique), d'acide gentisique, de coumarines (scopolétine, esculétine et ombelliférone). Bien que la rutine et les glycoflavones soient entre elles dans les mêmes proportions, leur taux, dans l'extrait total, devient beaucoup plus faible que pour les feuilles témoins.

B) EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LE CONTENU EN FLAVONOIDES DE LA TIGE DES PLANTS TRAITES PAR LA COUMARINE

La comparaison des figures 39 et 40, correspondant respectivement aux parties basales et aux régions apicales de la tige épicotylée, fait apparaître deux différences.

La première concerne le taux de rutine qui est plus faible dans les régions âgées. Le même processus a été signalé plus haut pour les plants témoins, et à un moindre degré, pour les séries traitées par l'acide gibberellique et par la kinétine.

La deuxième est la biosynthèse dans les régions âgées de tiges (comme dans la région hypocotylaire) d'un dérivé d'acide gentisique G, absent des régions jeunes.

La formation d'un dérivé d'acide gentisique au cours du vieillissement a été étudié pour des tiges volubiles de Humulus lupulus (195) et les tiges semi-rampantes de P. aviculare (197). Ces exemples viennent à l'appui de l'hypothèse de GRIFFITHS (49) qui a trouvé de l'acide gentisique dans un grand nombre de familles (ou genres) comprenant des espèces ligneuses, et montré son absence chez les Monocotylédones et des espèces herbacées. Cet auteur considère l'acide gentisique comme un précurseur possible de la lignine.

La formation dans les régions âgées de plants CMA d'un dérivé d'acide gentisique, absent des régions de même âge formel des plants TEM, peut être considéré comme la preuve d'un vieillissement accéléré. Elle suppose cependant des processus biosynthétiques nouveaux.

La coumarine, qui a un effet inhibiteur sur l'élongation de P. tataricum, diminue également la durée de la période de croissance. Les plants traités par la coumarine à 100 ppM, n'ont pas ainsi au 35ème jour le même âge physiologique que les plants témoins, ils sont en fait, beaucoup plus âgés. La région basale de la tige de ces plants CMA serait utilement comparée, quant à leur contenu en flavonoides, non pas avec la région homologue de plants TEM de même âge, mais avec celle de sujets TEM atteignant leur période de fin de croissance (époque de la maturation des graines).

Ainsi la formation d'acide gentisique, indice de vieillissement, ne peut avec certitude être rapportée à une action directe de la coumarine dont l'effet, sur ce point, serait seulement d'accélérer la sénescence. L'augmentation progressive des pigments anthocyaniques du sommet à la base de la tige est également un signe de vieillissement.

C) LES FLAVONOIDES DES PLANTS TRAITES PAR LA COUMARINE A 50 ppM

Nous allons brièvement considérer le cas des sujets traités par la solution faible de coumarine. Ces plants dont l'aspect morphologique est subnormal, et qui n'ont subi qu'une très légère diminution de leur élongation, ont montré cependant un bouleversement de leurs corrélations de croissance. Ce symptôme, qui aurait pu passer inaperçu si nous n'avions pas procédé à des mesures journalières de croissance, est à notre sens la preuve de très importantes modifications des processus physiologiques.

Or, l'étude que nous avons effectuée des divers extraits de ces plants fait apparaître de très importantes différences avec les témoins dans leur contenu en flavonoides. Les substances néoformes sont : P (dérivé d'acide p-coumarique et G d'acide gentisique mais elles se trouvent en plus petite quantité. De plus, l'hydrolyse acide ne fait apparaitre ni esculétine, ni ombelliférone. Notons que ni les spots 1, 2, 3 et 4, ni E n'existent dans les extraits de cette série CMA.

Ainsi la coumarine induit un profond remaniement des flavonoides même lorsqu'elle est employée à des loses qui n'entraînent pas d'inhibition.

D) DISCUSSION

La première remarque qui s'impose c'est que l'inhibition de croissance et de développement très marquée observée pour les plants de P. tataricum traités par la coumarine à 100 ppM, s'accompagne de profondes modifications du contenu en flavonoides. Si l'on pouvait s'attendre à des remaniements des flavonoides à la suite de traitements par la coumarine (J. TRONCHET 193) il était difficile de les prévoir exactement, aucun document bibliographique n'existant à ce sujet.

Il est assez surprenant de constater que dans les extraits de sujets CMA on retrouve un certain nombre de substances néoformées (depsides d'acides p-coumarique et férulique et deux dérivés de scopolétine) à la suite de traitements par la kinétine, dont l'effet sur la croissance s'est montré exactement opposé à celui de la coumarine. Cependant le traitement par la coumarine induit la néo formation de plusieurs autres substances dérivées des acides p-coumarique et gentisique et surtout des coumarines esculétine et ombelliférone.

Les cartes chromatographiques obtenues à partir des extraits des sujets soumis à un traitement par la coumarine sont ainsi extrémement complexes, beaucoup plus que celles des témoins, et même que celles, (déjà profondément modifiées), des plants traités par la kinétine.

La présence de plusieurs dérivés coumariniques dans ces extraits justifie sans doute la très forte inhibition de croissance observée dans la série CMA (à 100 ppM).

SIXIEME PARTIE

DISCUSSION D'ENSEMBLE SUR NOS RESULTATS CONCERNANT LE CONTENU EN FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS ET SES MODIFICATIONS A LA SUITE DES DIVERS TRAITEMENTS

I

A) RESULTATS CONCERNANT LES FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS

Nous allons considérer tout d'abord ce que l'inventaire des flavonoides des plants TEM de P. tataricum nous a apporté comme renseignements. Ensuite nous comparerons les divers résultats concernant les séries traitées, non plus par rapport aux témoins - ce qui a été fait au fur et à mesure de l'étude biochimique - mais entre eux.

- Nous avons montré que la rutine, 3-rhamnoglucoside de quercétine, se retrouve partout, de la base de la tige à son sommet, ainsi que dans les feuilles, et nous avons vu qu'elle se maintient, malgré les traitements dans toutes les séries traitées.

Il en est de même pour les acides chlorogénique vrai et néochlorogénique qu'on observe constamment. Les seuls flavonoides représentés dans les très jeunes hypocotyles sont encore la rutine et les deux acides chlorogéniques.

- La présence de dérivés de kaempferol dans les seuls hypocotyles âgés est le signe d'une disparité importante entre les régions hypocotylaire et épicotylaire de la tige. Le noeud cotylédonaire constituerait ainsi une barrière pour ce flavonol. Cette relative autonomie biochimique de l'hypocotyle concorde avec les observations tant morphologiques qu'anatomiques qui font apparaitre des différences entre cette région et l'épicotyle.

- Nous avons pu identifier les quatre C-glycosides de flavones, orientine et homo-orientine, vitexine et saponarétine, qui dans les feuilles accompagnent la rutine. Ces substances sont caractéristiques des feuilles de P. tataricum dont le contenu en flavonoides montre ainsi une grande dissemblance avec celui des tiges.

- Un autre point remarquable c'est l'extrême simplicité de la carte chromatographique. Dans les hypocotyles très jeunes nous n'observons que trois substances : un hétéroside de quercétine (rutine) et deux acides chlorogéniques. Dans les régions âgées nous n'avons pu déceler aucune substance de dégradation, aucun autre spot réagissant au BARTON, et il en est de même dans les feuilles. Nous considérons que les plants TEM de P. tataricum constituent à cet égard, une exception. En effet, il est couramment observé (174 à 199, J. TRONCHET) au moins pour des régions âgées, des substances à fluorescences bleues ou invisibles même en U.V., et donnant de fortes réactions au BARTON, qui composent une carte chromatographique beaucoup plus complexe. Dans notre espèce nous considérons que les voies biosynthétiques sont peu nombreuses aboutissant, en priorité, à la formation de rutine et d'acides chlorogéniques.

B) CONFRONTATION DES RESULTATS CONCERNANT LES DIVERS REAJUSTEMENTS DES FLAVONOIDES POUR LES PLANTS SOUMIS A DIFFERENTS TRAITEMENTS

Au cours de notre étude, nous avons systématiquement comparé pour chaque série traitée son contenu en flavonoides avec celui des régions (ou des organes) homologues des plants témoins, cultivés en même temps et dans les mêmes conditions de culture.

Nous allons maintenant comparer ces divers résultats entre eux et tenter d'en tirer des indications générales sur l'effet de l'acide gibberellique, de la kinétine et de la coumarine sur la teneur en flavonoides d'une espèce contenant de la quercétine.

1- Nous avons montré que les divers traitements agissent sur l'élongation, la durée de la période de croissance et le développement et nous observons des remaniements corrélatifs des flavonoides, plus ou moins importants suivant les séries. Les réactions des plants concernant leur développement sont différentes d'une série à l'autre et les réajustements des flavonoides sont également dissemblables.

La gibberelline et la kinétine se comportent comme des facteurs de croissance favorisant l'élongation, et retardant la senescence. Dans nos conditions de culture c'est la kinétine qui se montre la plus efficace. La coumarine, elle, agit comme un puissant inhibiteur lorsqu'elle est employée à la concentration de 100 ppM, et à dose plus faible (50 ppM), entraîne des dysharmonies de croissance.

2- Pour les séries TEM le phénomène physiologique du vieillissement se traduit seulement par la diminution du taux des flavonols et surtout de la rutine. Un résultat analogue est obtenu pour les séries GIBB et KIN où nous observons cependant un net ralentissement de ce processus ce qui nous a amené à conclure à un retard de sénescence corrélatif aux traitements. L'effet de la coumarine est tout différent et nous voyons apparaître dans les régions âgées des plants CMA un dérivé d'acide gentisique dont la présence peut être interprétée comme un symptôme de vieillissement accéléré. La synthèse d'acide gentisique ne peut être avec certitude rapportée à l'action directe de la coumarine. Il est en effet possible - et cela fera l'objet d'études ultérieures - que ce polyphénol apparaisse également dans les plants témoins, mais beaucoup plus tard, après la maturation des graines, et alors que la croissance est définitivement terminée.

3- Un autre point important à noter c'est que l'effet de l'acide gibberellique de la kinétine ou de la coumarine est le même dans la plante entière dont toutes les régions (ou organes) subissent des modifications analogues de leur contenu en flavonoides. Ce fait nous autorise à considérer maintenant les résultats globaux pour un traitement donné.

Les remaniements entrainés par l'A G sont simples, dirigés dans un seul sens : l'augmentation des hétérosides de flavonols. Il n'y a pas synthèse de nouvelles substances et la seule disparition observée est celle

du pigment anthocyanique dans les régions très jeunes de la tige.

Pour les séries KIN et plus encore CMA les extraits sont très complexes, ils se chromatographient mal, les spots restant accrochés les uns aux autres. Dans ces séries, les plants, au moment de la récolte sont le siège de processus biosynthétiques nouveaux qui pourraient produire, en plus faible quantité, des substances intermédiaires dont la position chromatographique serait peu différente de celle des substances définitives. Cette hypothèse fournit peut être une explication à la mauvaise séparation des spots.

4- Les traitements par l'acide gibberellique comme par la kinétine augmentent la teneur en flavonols. Dans ces deux séries la rutine devient largement dominante mais elle atteint son taux le plus élevé dans les feuilles des sujets KIN dont la carte chromatographique est nettement anormale. Elle montre en effet un énorme spot de rutine, et les quatre glycoflavones (orientine, homo-orientine, vitexine et saponarétine) n'existent qu'à l'état de traces.

La coumarine semble ne pas avoir d'effet sur les flavonols et flavones mais leur taux devient beaucoup plus faible - la rutine cesse d'être dominante - par suite de la formation de plusieurs autres substances. La biosynthèse n'est plus orientée dans le seul sens des flavonols ou des flavones.

5- Dans les séries traitées à la kinétine et à la coumarine nous voyons apparaître des substances à fluorescences bleues. Ces substances néoformées proviennent d'aglycones nouvelles. Il n'y a pas eu seulement multiplication de dérivés plus ou moins osidés d'aglycones préexistantes mais synthèse de novo.

Nous avons schématisé dans le tableau XII pour les différentes régions (ou organes) des séries TEM, GIBB, KIN et CMA leur contenu en flavonoides en indiquant que les aglycones.

Toutes celles de la série TEM se retrouvent dans les régions homologues des plants traités de toutes les séries.

Les aglycones néo-formées communes aux deux séries KIN et CMA sont les acides cinnamiques, p-coumarique et férulique et la scopolétine, celles qui sont particulières à la série CMA sont deux autres coumarines l'esculétine et l'ombelliférone, et l'acide gentisique, 2,5-di hydroxybenzoique. Chacune de ces aglycones donne au moins un dérivé, et parfois plusieurs, et les cartes chromatographiques deviennent extrêmement complexes. Ces faits sont le signe de profonds bouleversements des processus bio-synthétiques.

TABLEAU XII

	Plants témoins	Plants traités par l'A. G.	Plants traités par la kinétine	Plants traités par la coumarine
FEUILLES	Quercétine + + Acide caféique Apigénine + + Lutéoline + +	Quercétine + + + Acide caféique Apigénine + + Lutéoline + +	Quercétine + + ++ Acide caféique Apigénine Lutéoline Acide p-coumarique Acide férulique Scopolétine +	Quercétine + + Acide caféique Apigénine + + Lutéoline + + Acide p-coumarique+ Acide férulique Scopolétine Esculétine Ombelliférone Acide gentisique Acide o-coumarique?
TIGE JEUNE	Anthocyanidine Quercétine + Acide caféique	Quercétine + + Acide caféique	Anthocyanidine ++ Quercétine + + + Acide caféique Acide p-coumarique Acide férulique Scopolétine +	Anthocyanidine++ Quercétine + Acide caféique Acide p-coumarique+ Acide férulique Scopolétine Ombelliférone Acide o-coumarique?
TIGE AGEE	Anthocyanidine + Quercétine Acide caféique	Anthocyanidine Quercétine + Acide caféique	Anthocyanidine ++ Quercétine + + Acide caféique Kaempferol Acide p-coumarique Acide férulique Scopolétine +	Anthocyanidine ++ Quercétine Acide caféique Kaempferol Acide p-coumarique + Acide férulique Scopolétine Ombelliferone Acide gentisique Acide o-coumarique ?
HYPOCOTYLES AGES	Anthocyanidine ++ Quercétine Acide caféique Kaempferol	Anthocyanidine + Quercétine + Acide caféique Kaempferol	Anthocyanidine +++ Quercétine + + Acide caféique Kaempferol Acide p-coumarique Acide férulique Scopolétine	Anthocyanidine +++ Quercétine Acide caféique Kaempferol Acide p-coumarique + Acide férulique Scopolétine Ombelliferone Acide gentisique + Acide o-coumarique
HYPOCOTYLES JEUNES	Quercétine + Acide caféique			

Un certain nombre de substances néo-formées sont communes aux séries KIN et CMA bien que les effets des deux traitements sur la croissance soient opposés. Il semble paradoxal de trouver des depsides d'acides cinnamiques (p-coumarique et férulique) dans les plants traités CMA, à croissance fortement inhibée, et inversement de reconnaître la présence de coumarines dans les plants KIN dont la taille et la robustesse sont très nettement supérieures à celles des témoins. L'action physiologique de ces diverses substances est vraisemblablement une question de taux. Ainsi l'apparition d'esculétine et d'ombelliférone dans les plants CMA augmente la proportion des coumarines qui deviennent alors dominantes.

Si les réajustements du contenu en flavonoides de P. tataricum sous l'action de l'acide gibberellique peuvent être intégrés à ceux précédemment observés, notre espèce se situant à cet égard (de même que P. aviculare 197) entre les espèces réfractaires et celles qui montrent des mouvements révolutifs (186, 190) il en est tout autrement pour nos résultats originaux concernant l'effet de la kinétine et de la coumarine où l'interprétation est rendue difficile par le fait qu'il s'agit d'exemples uniques.

II

RECAPITULATION ET CONCLUSIONS

Notre travail a porté sur une espèce de grande culture Polygonum tataricum L. pour laquelle nous disposions d'une bonne quantité de graines provenant du Jardin Botanique de Besançon récoltées en 1964 et 1962.

Les plants sont cultivés dans des salles d'expériences où la température se maintient à approximativement 25° C, sous un éclairage de lumière blanche continue (tubes "Phytor") d'environ 5000 lux au niveau des régions apicales des plants. Les conditions d'environnement auxquelles ceux-ci sont soumis sont donc anormales, surtout pour une espèce de grande culture, mais présentent l'avantage de fournir des résultats exactement reproductibles.

Les plantules repiquées deux à trois jours après la germination constituent des lots homogènes. Pour chaque série traitée comprenant environ 50 sujets nous cultivons en même temps une série de plants témoins.

Les traitements sont effectués par badigeonnages des régions apicales tous les jours à la même heure et poursuivis plus ou moins longtemps suivant les substances appliquées.

Nous avons procédé chaque jour à la même heure, pour une quinzaine de plants de chaque série (témoins et traités) à des mesures de l'élongation de la tige. Ces données nous permettent d'établir des courbes et diagrammes et de mettre en évidence certaines corrélations de croissance.

1ère PARTIE : CROISSANCE ET DEVELOPPEMENT

I- Croissance et développement des plants témoins.

Les plants témoins de toutes les séries ont un développement normal dans les conditions de culture qui leur sont offertes, ils fleurissent et le 33ème jour - période de la récolte en vue de la préparation des extraits - ils atteignent 80 cm (les plants issus de graines de 1962 ont une taille moyenne un peu plus faible).

Pour tous les plants témoins, c'est le quatrième entre-noeud de la partie épicotylée de la tige qui atteint la plus grande longueur. Nous avons pu montrer également qu'un seul entre-noeud à la fois subit un accroissement journalier notable.

II- Croissance et développement des plants GIBB.

Le traitement gibberellique commencé précocement est appliqué pendant 29 jours consécutifs. Comme on pourrait s'y attendre il induit très vite une élongation anormale de la tige qui atteint le 33ème jour après le repiquage 130 cm. Nos mesures nous ont permis de montrer que l'accroissement journalier, beaucoup plus élevé que pour les témoins, se répartit sur une plus grande longueur de la tige dont plusieurs entre-noeuds croissent en

même temps et qu'ainsi aucune région limitée de la tige ne montre un taux de croissance anormal. Ce fait justifie sans doute l'échec du traitement GIBB concernant l'induction de mouvements révolutifs.

III- Croissance et développement des plants traités à la Kinétine.

Le traitement par la kinétine est poursuivi pendant 9 jours (du 8ème au 17ème), soit avec une solution forte (100 ppM) soit avec une solution moins concentrée (50 ppM). Les plants traités des deux séries réagissent très vite au traitement par une élongation accrue. Ils sont très robustes, et leurs feuilles sont plus vertes et beaucoup plus larges que celles des plants témoins, et ils fleurissent abondamment.

Un fait remarquable est le développement sur l'hypocotyle et les deux entre-noeuds inférieurs, de très nombreuses et très longues racines adventives qui s'enfoncent dans la terre des pots. Nous notons cependant pour les témoins, une tendance à former, sur l'hypocotyle seulement, de courtes et rares racines adventives.

La kinétine apparait ainsi, et dans nos conditions de culture, comme extrêmement favorable à la croissance et au développement de P. tataricum.

IV- Croissance et développement des plants traités par la coumarine.

L'application de coumarine a été faite beaucoup plus tardivement, le 15ème jour après le repiquage, et a été poursuivie pendant 7 jours. Si les plants traités par la solution faible (50 ppM) ont un développement subnormal, ceux traités par la solution de coumarine à 100 ppM montrent une inhibition considérable de leur élongation : ils ne croissent que de 10 cm, ne fleurissent pas et ont un aspect nettement maladif. Nos mesures ont permis de mettre en évidence des dysharmonies de croissance pour les plants soumis au traitement à 50 ppM qui paraissaient avoir peu souffert. La coumarine perturbe ainsi fortement la croissance de P. tataricum même lorsqu'elle ne paraît pas avoir d'effet nocif.

L'étude biochimique des extraits éthanoliques est faite par chromatographie sur papier, en double dimension, ce qui nous a permis d'établir des cartes chromatographiques. Nous étudions séparément les extraits correspondant aux différentes régions de la tige (hypocotyle, région basale âgée, région apicale jeune) et aux feuilles pour les plants témoins et traités.

2ème PARITE : LES FLAVONOIDES DES PLANTS TEMOINS

La substance dominante est la rutine, 3-rhamno glucoside de quercétine. Dans les tiges elle est accompagnée par un autre 3-hétéroside de quercétine, l'hypérine, et par deux acides chlorogéniques, l'acide chlorogénique vrai et l'acide néo-chlorogénique. Dans les feuilles nous la retrouvons, ainsi que les acides chlorogéniques, mais la carte chromatographique est très différente du fait de la présence de quatre glycoflavones, rebelles à l'hydrolyse acide, que nous avons déterminées comme étant l'orientine et

l'homo-orientine (dérivés de lutéoline) et la vitexine et la saponarétine (dérivés de l'apigénine). Nous donnons pour ces quatre substances, qui n'avaient pu jusqu'alors être identifiées dans P. fagopyrum, espèce très voisine de la nôtre, et qui n'avaient pas été signalées dans P. tataricum, les valeurs de Rf et les courbes d'absorption en ultra violet dans plusieurs milieux.

Nous mettons en évidence une certaine autonomie biochimique de la région hypocotylaire de la tige, qui est seule à contenir des hétérosides de kaempferol et une nette disparité entre la tige et les feuilles.

Pour étudier les modifications du contenu en flavonoides au cours du vieillissement nous comparons les régions apicales jeunes aux régions âgées des mêmes tiges, et les hypocotyles très jeunes (3 jours) à la région hypocotylaire des plants de 33 jours. Dans les deux cas la sénescence se traduit par une diminution des hétérosides de quercétine et par l'augmentation des anthocyanes.

3ème PARTIE : LES FLAVONOIDES DES PLANTS GIBB

Le réajustement des flavonoides à la suite du traitement gibberellique se produit dans le même sens -augmentation du taux des flavonols et diminution éventuelle des pigments anthocyaniques - que celui précédemment observé pour d'autres espèces. Nous n'observons aucune modification qualitative importante des flavonoides et notamment aucun nouvel hétéroside de quercétine. Les processus de vieillissement apparaissent fortement ralentis.

Ces résultats sont analogues à ceux obtenus au Laboratoire pour d'autres plantes soumises au même traitement gibberellique et en particulier P. aviculare. Dans ces deux cas, en effet, le traitement s'il augmente dans une forte mesure l'élongation, n'induit pas de mouvements révolutifs. A cet égard, le traitement gibberellique s'est soldé par un échec.

4ème PARTIE : LES FLAVONOIDES DES PLANTS KIN

Les plants de P. tataricum traités par la kinétine à 50 ppM comme à 100 ppM montrent de très importantes modifications, tant qualitatives que quantitatives, de leurs flavonoides.

Les nouvelles substances (à fluorescences bleues) qui apparaissent dans les chromatogrammes se retrouvent dans la plante entière, tige à tous les niveaux, et feuilles. Ce sont : deux acides p-coumaryl-quiniques, un acide féroyl-quinique, deux dérivés de scopolétine, la scopoline et un dérivé di-glycosé (sans doute fabiatrine).

Un autre effet du traitement c'est l'augmentation parfois considérable des hétérosides de quercétine, et surtout de la rutine. Dans les chromatogrammes d'extraits de feuilles, le spot de rutine est énorme, démesuré, alors que les quatre glycoflavones sont réduites à l'état de traces. La carte chromatographique correspondant aux feuilles des plants KIN est ainsi extrêmement dissemblable de celle des mêmes organes des plants témoins.

Nous notons peu de différences dans les flavonoides entre les régions jeunes et âgées de la tige épicotylée. Nous interprétons ce fait comme un retard dans les processus de vieillissement, retard d'ailleurs observable sur les plantes entières traitées par la kinétine qui, au 35ème jour (époque de la récolte) sont encore en pleine période de croissance.

Un autre résultat important c'est que la région hypocotylaire semble avoir perdu son autonomie biochimique : les dérivés de kaempferol se trouvant également dans la région basale de la tige épicotylée.

5ème PARTIE : LES FLAVONOIDES DES PLANTS CMA

Pour les sujets traités par la coumarine à 100 ppM et à croissance fortement inhibée, nous retrouvons toutes les substances apparues dans les chromatogrammes des plants KIN, soit : les depsides d'acides p-coumarique et férulique et les deux dérivés de scopolétine.

Mais nous observons de plus un autre dérivé d'acide p-coumarique (sans doute ester glycosé) et un d'acide gentisique (absent cependant des régions apicales de tiges) et dans les aglycones des extraits totaux de l'ombelliférone et de l'acide o-coumarique. La présence de ce dernier peut être dûe à l'existence de petites quantités de coumarine libre, résidu des badigeonnages. Quant à l'ombelliférone nous n'avons pu la relier avec certitude à des spots, bien que quatre faibles spots à fluorescences bleu-violet restant indéterminés puissent lui être attribués.

Le dérivé d'acide gentisique ne se trouve que dans les régions âgées (hypocotyle et région basale de la tige épicotylée) et dans les feuilles adultes, en moindre quantité. Ce fait peut être interprété comme un signe de vieillissement.

6ème PARTIE : DISCUSSION GENERALE

Dans la dernière partie de notre travail nous comparons les résultats concernant les réajustements des flavonoides à la suite des divers traitements, et nous avons pu dresser un tableau général (tableau XII) particulièrement significatif à cet égard. Dans ce tableau où nous ne tenons compte cependant que des aglycones, les différences apparaissent très importantes d'une part entre chaque série et la série témoin, et d'autre part entre les trois séries traitées.

Seuls les traitements par la kinétine et la coumarine entrainent la synthèse de nouvelles aglycones et, à l'intérieur de chaque série, celles-ci sont les mêmes pour toutes les régions ou organes (sauf l'esculétine dans les feuilles CMA). Cependant l'interprétation de ces résultats est rendue difficile du fait qu'ils ne concernent qu'un seul cas, celui de P. tataricum, et qu'il n'est pas sûr qu'une autre espèce à contenu en flavonoides nécessairement différent, se comporte dans le même sens.

Nos recherches apportent ainsi une preuve que les modifications importantes - et dissemblables - de la croissance et du développement observées pour les diverses séries traitées se traduisent constamment par des bouleversements plus ou moins marqués de leur contenu en flavonoides.

BIBLIOGRAPHIE

1- AHLGRIMM E.D. 1955, The content of total flavonols and of rutin in leaves of different ages in Fagopyrum sps." Naturwiss 42 (16) 465-466 ill. 1955. Biol. Abst. 5860 - 1957.

2- AHLGRIMM E.D. 1956, "Contributions to the question of biogenesis of secondary metabolic products as illustrated in Mentha piperata and species of Fagopyrum" Germ. Planta 47 (3) 255-298 - 1956 Biol. Abst. 12140 - 1957.

3- ALLSOPP, A, & SZWEYKOWSKA A. 1960, Nature 186. 813-14. 1960.

4- ARITOMI M. 1963, Chemical constituents in aceraceous plants - I flavonoid constituents in the leaves of Acer palmatum. J. Pharm. Soc. Jap. 1963. 83 N° 7 P. 737-40.

5- ARITOMI M. 1964, Chemical constituents in aceraceous plants. III. Flavonoid constituents in leaves of Acer cissifolium. Chem. Pharm. Bull. (Japan) 12 : 7. 841-843. 1964. 26.12.3456. Bull. Sign. 3. 1965.

6- AUDUS L.J. 1948, Studies on the phytostatic action of 2-4 D and coumarin The reversibility of root Growth inhibitors. New. Phytologist. 47. 196-219. 1948.

7- BAILLAUD L., MONNIER Y. 1960, La circumnutation de la tige d'un Phaseolus devenu volubile par l'acide gibberellique. C.R. Acad. Sci. Paris, 250, pp. 4032-4034.

8- BAILLAUD L. et al. 1962, Quelques expériences relatives à l'induction du Port Volubile par l'Acide Gibberellique. Eigenschaften und wirkungen der Gibberelline. Springer - Verlag; Berlin. P. 130-135. 1962.

9- BAILLAUD L. & COURTOT Y. 1962, Essai de coordination des faits expérimentaux concernant l'induction du port volubile par l'acide gibberellique. In : Eigenschaften und Wirkungen der gibberelline. Edit. R. Knapp. P. 136-145. Springer - Verlag - Berlin. 1962.

10- BAMBERGER E. & MAYER A.M. 1960, Science 131. 1094-95. 1960.

11- BARBER G.A. & W.2. HASSID. 1963, "In vivo oxidation of L-rhamnose and L-glucose by higher plants". Bull. Res. Com. Israël Sec. A. Chem. 11 (4) 249-252 - 1963.

12- BARGER G. 1906, J. Chem. Soc. 89. 1210. 1906.

13- BARTON G.M, EVANS R.S. & GARDNER J.A.F. 1952, Paper chromatography of phenolic substances. Nature - 170. 249. 1952.

14- BATE SMITH E.C. 1954, "Ferulic, Sinapic and related acids in leaves". Chem. & Ind. 1457-1458 - 1954.

15- BATE SMITH E.C, SWAIN T. 1960, "Glycoflavonols" ? Chem. and Ind. 3 6 - 1132-4 - 1960.

16- BATE SMITH E.C. 1963, Paper chromatography of phenolics. Methods in polyphenol chemistry. Pergamon Press. Oxford. P. 73. 1964.

17- BERNARD O. PHINNEY & Charles A. West. 1961, Gibberellins and plant growth. Encyclopedia of plant physiology. Vol. XIV. Spinger - Verlag Berlin. P. 1185. 1961.

18- BLAIN K. & H.M. BLAIN. 1961, Investigations on chemical composition of the fruits of buckwheat (F. sagittatum) & tatary buckwheat (F. tataricum). Roez. Nank. Rolniczych Ser. A. 81 (3) 621-629. (Russ) Biol. Abst. 33428 - 1961.

19- BLANK F. 1958, Anthocyanins, flavones, xanthones. In Encyclopedia of plant Physiology. Vol. 10. P. 300-353. 1958.

20- BOPP MARTIN & MEINRAD BALL. 1960, "Flavonoids of Streptocarpus blossoms." Naturwissenschaften 47 - 159-160. (Chem. Abst. 15635 c 1961). 1960.

21- BRANDL J. & SCHARTEL G. 1912, Untersuchung über das Fagopyrum Rutin. Arch. Pharm. 250- 414-417. 1912.

22- BRUNEL A. 1952, Traité de Chimie Végétale. 4. Tourcoing Frère. 1952.

23- BUTLER W.L, SIEGELMAN H.W. 1959, Conversion of caffeic acid to esculetin during paper chromatography. Nature 1959. 183, N° 4678. 1813-1814. 1959.

24- CARTWRIGHT R.A. & et al. 1954, "Paper chromatography of phenolic substances". Chem. Ind. P. 1389 - 1954.

25- CARTWRIGHT R.A. & ROBERTS E.A.H. 1955, Theogallin as a galloyl ester of quinic acid. Chem. & Ind. 230-231. 1955.

26- CARTWRIGHT R.A, ROBERTS E.A.H, FLOOD A.B.E. and WILLIAMS A.H. 1955, The suspected presence of p-coumaryl-quinic acids in tea, apple and pear. Chem. & Ind. P. 1062-1063. 1955.

27- CAVANNA D., ROCCHIETTA S. 1958, Ormoni vegetali : auxine, kinetine, gibberelline. Bol. Chim. Farm. Ital. 97 : 3. 156-61. 1958.

28- CHAUDHARY D.N, HOLLAND R.A. & ROBERTSON A. 1948, "The synthesis of glycosides Part. XII Fabiatrin". Journ. Chem. Soc. P. 1671. 1948.

29- CORMAN I. 1946, Alteration of mitosis by coumarin and parascorbic acid. Amer. Jour. of Bot. (Abst). 33. P. 217. 1946.

30- - 1947, The responses of onion and lily mitosis to Coumarin and parascorbic acid. Jour. Expt. Bot. 23. 292-97. 1947.

31- COUCH J.F. & et al. 1946, Buckwheat as a source of Rutin. Science 103. 197-198. 1946.

32- - 1949, Tatary buckwheat as a source of Rutin. U.S. Dept. Agri. Bur. Agri. and Ind. Chem. A I C 222. 1949.

33- COURTOIS J.E. & P. PERLES. 1959, Précis de Chimie Biologique. Tom 1. P. 285-286. Masson et Cie. Paris. 1959.

34- COURTOT Y. 1962, Action de l'acide gibberellique sur la forme des cladodes de l'Asparagus medeoloides. C.R. Acad. Sci. Paris, 255, pp. 1412-14. 1962.

35- - 1965, Recherches sur la morphologie, l'anatomie, la croissance et les mouvements révolutifs de deux Liliacées, Bulbine annua et Asparagus medeoloides. Thèse Sci. Besançon. Mars 1965.

36- CROSBY D.G, BERTHOLD R.V. 1962, Flourescence spectra of some simple coumarins. Anat. Biochem. 4 N° 5. 349-57. 1962.

37- DEYSSON G. 1959, Action de la Kinétine et de la Thiokinétine sur la division et l'élongation cellulaires dans les racines d'Allium sativum. C.R. Acad. Sci. Fr. 248 : 8. 1214-1216. 1959.

38- ENDO T. 1959, "Biochemical and genetical investigations of flower colour in swiss giant pansy - Viola wittrokiana Gam. 11 - Part." "Chromatographic studies on anthocynin components." Bot. Mag. Japan 1952 Vol. 72 N° 857 pag. 10-19. 1959.

39- ENGELBRECHT L. & MOTHES K. 1961, The effect of Kinetin on the development of roots. Plant & Cell. Physiology. 2. 271-276. 1961.

40- ESDORN I. & GERTRUND N. 1955, "Investigations of diurnal variations in flavonol content of some Fagopyrum species". Planta 45 (4) 376-378. 1955. Biol. Abst. 17622. 1956.

41- EVANS W.H. & et al. 1957, Vitexin - Part I. Jour. Chem. Soc. P. 3510. 1957.

42- EVENARI M. 1952, The relation between the structure of coumarin and its derivatives and the activity as germinating inhibitors. Jour. Expt. Bot. 3. P. 246-252. 1952.

43- - 1957, The Physiological Action and Biological importance of germination inhibitors. The Biological action of Growth substances. Symp. of the Society for Expt. Biol. N° XI. The University Press Cambridge. 1957.

44- GAGE T.B. & et al. 1951, "Identification of flavonoid compounds by filter paper chromatography". Anal. Chem. 23 N° 11. P. 1582-1585. 1951.

45- GAMBORG O.L. & A.C. NEISCH. 1959, "Biosynthesis of Phenylalanine and tyrosine in young wheat and buckwheat plants". Canadian Journ. of Biochem. & Physiol. 37 (11) 1277-1285. 1959. Biol. Abst. 14185. 1960.

46- GEISSMAN T.A. 1955, Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water soluble plant pigments. Modern methods of plant analysis. Vol. 3. P. 450. Springer - Verlag. Berlin. 1955.

47- - 1956, The flavonoid constituents of normal and virus infected peach and cherry leaves. Arch. of Biochem. & Biophys. 60. 21-27. 1956.

48- GRIFFITHS L. 1957, Separation and identification of aromatic acids in plant tissues by paper chromatography. Nature 180. 286-287. 1957.

49- GRIFFITHS L.A. 1959, On the distribution of gentisic acid in green plants. J. Expt. Bot. 10 : 30. 437-442. 1959.

50- GRIMS M. 1959, Prilog poznavanju flavonoidnog sadrzaja biljke. Hypericum perforatum i nekih drugih hypericum vrsta. Acta pharm. Jugoslavica. 9 (3) 113-126. BA. 35. 3. 1960. 39210. 1959.

51- JARL GRIPENBERG. 1962, Flavones in Geissman. The chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press. London. P. 406-440. 1962.

52- GUTTMAN R. 1956, Chromosoma. 8. P. 341-350. 1956.

53- - 1957, J. Biophys. Biochem. Cytol. 3. 129-131. 1957.

54- HANSEL R. & L. HORHAMMER. 1954, Phytochemisch - systematische Untersuchung über die Flavonglykoside einiger Polygonaceen. Arch. Pharm. 287/59 : 4. 189-198. 1954.

55- HANSEL R. 1959, In Linskens. Paper chromatographie in der Botanik. "Anthocyane und flavonoide". Springer - Verlag. Berlin. 1959.

56- HARBORNE J.B. 1959, The chromatography of the flavonoid pigments. J. chromatography, Ned. 2. 6. P. 582-604. 1959.

56 bis- - 1959, Plant Polyphenols. 2. The coumarins of Solanum pinnatisectum. Bioch. J. 74, pp. 270-273. 1959.

57- HARBORNE J.B, CORNER J.J. 1961, Plant Polyphenols. IV. Hydroxycinnamic acid - sugar derivatives. Biochem. J. 81 N° 2 242-250. 1961.

58- HARBORNE J.B. 1963, Ultra-violet spectroscopy of polyphenols. In Methods in polyphenol chemistry; Pergamon Press. Oxford. P. 13. 1964.

59- HARBORNE J.B. & E. HALL. 1964, Plant Polyphenols - XII. The occurence of Tricin and of glycoflavones in Grasses. Phytochemistry 3 : 3. 421-428. 1964.

60- HARBORNE J.B. 1965, "Plant Polyphenols - XIV. Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymatic hydrolysis". Phytochemistry Vol. 4 N° 1 P. 107-120. 1965.

61- HESLOP. HARRISON. 1963, Plant Growth Substances. In Recent Research in Plant Physiology. Vistas in Botany. Vol. 3. Edit. Dr. W.B. Turrill. Pergamon Press. 1963.

62- HATHWAY D.E. 1960, Plant phenols and tannins. In chromatographic and electrophoretic. Tech. Vol. I Chromatography. Interscience publishers. New York. 308-354. 1960.

63- HATTORI S. 1962, "Glycosides of flavones and Flavonols" in GEISSMAN. "The chemistry of flavonoid compounds". Pergamon Press London. p. 317-352. 1962.

64- HEMBERG T. 1961, Biogenous inhibitors. Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 14. P. 1162-1179. 1961.

65- THOMAS R. HENDERSON, CHARLES, G, SKINNER & ROBERTS, E, EAKIN. 1962, Kinetin & Kinetin anelogues as substrates and Inhibiters of Xanthine oxidase. Plant. Phys. 37 : 4. 552-556. 1962.

66- HOPFNER W. 1932, Chem. Ztg. 56. 991. 1932.

67- HORHAMMER L. & S.B. RAO. 1955, "Uber die Isolierung von Quercitrin aus Polygonum hydropiper". Arch. Pharm. U. Berlin deutsch Pharm. Ges. 287 (50) 34-36. 1954. (Biol. Abst. 29630. 1955).

68- HORHAMMER L. & A. SCHERM. 1955, Uber das Vorkommen zyklicher Pflanzensäuren bei einigen Polygonaceen und Betulaceen. Arch. Pharm. 288/60 : 10. 441-447. 1955.

69- HORHAMMER L. and G. KRIESHAIR. 1955, "Zur kenntnis der Polygonaceenflavone 11. Uber die Nebenflavone aus Polygonum polystachy um". Arch. Pharm. U. Ber. deutsch Pharm. Ges. 288 (60) 489-494. 1955. Biol. Abst. 25841. 1957.

70- HORHAMMER L., H. WAGNER, & F. GLOGGENGIESSER. 1958, Uber einen neven Glykosidtyp der Flavonreihe. 1 - Mittelung : Isolierung eines Luteolin und Apigenin Glukosides aus Polygonum orientale L. Arch. Pharm. 291 (63) 3- 1958. 126-137.

71- HORHAMMER L., H. WAGNER & H.S. DHINGRA. 1959, Uber einen neven Glykosidtyp der Flavonreihe. II : Mitteilung : Isolierung eines zweiten schwer hydrolysierbaren Luteolinglykosides aus des Blüten von Spartium junceum. Arch. Pharm. 292/641 2. 1959.

72- HORHAMMER L., H. WAGNER, H. NEISCHLAG & G. WILDI. 1959, Uber einen neven Glykosidtyp der Flavonreihe. III : Mitteilung : Zur Konstitution von Orientosid und Orientin. Arch. Pharm. 292/64 : 7. 1959.

73- HORHAMMER L. H. WAGNER, & W. LEEB. 1960, Arch. Pharm. Ber. dtsch. Pharm. Ges. 293/65. 264. 1960.

74- HORHAMMER L. & H. WAGNER. 1961, New phenolic C-glycosides in plants. Recent developments in the chemistry of natural phenolic compounds. Edit. W.D. Ollis. P. 185. Pergamon Press. Oxford. 1961.

75- HOROWITZ R.M, GENTILI B. 1964, Structure of vitexin and isovitexin. Chem. & Ind. N° 12. 498-499. 1964.

76- HUMPHRIES E.C. 1958, Effect of gibberellic acid and Kinetin on growth of the primary leaf of dwarf bean (Phaseolus vulgaris). Nature, 181 : 4615. 1081-2. 1958.

77- HUMPHRIES E.C, & WHEELER A.W. 1960, The effects of Kinetin, Gibberellic acid and light on expansion and cell division in leaf disks of bean (Phaseolus vulgaris). Jour. of Expt. Bot. 31 : 11. 81-85. 1960.

78- IBRAHIM R.K. & TOWERS G.H.N. 1960, The identification by chromatography of plant phenolic acids. Arch. Biochem & Byophys. 87. 1. 125-128. 1960.

79- ICE G.H & WENDER S.H. 1953, Quercetin and its glycosides in leaves of Vaccinium myrtillus. J. Amer. Chem. Soc. 75. 50-52. 1953.

80- INGLETT G.E. & et al. 1959, Detection of pollen flavonoids by flourescence on impregnated papers. Mikrochim. Acta. 1. 95-100. 1959.

81- JANOT M.M. SAIAS E. & FOUCHER M. 1953, Chromatographie sur papier de quelques glucosides végétaux. Bull. Sté. Chim. Biol. 35 : 10. 1101-1110. 1953.

82- JURD L., T.A. GEISSMAN & M.K. SIEKEL. 1957, Arch. Biochem. Biophys. 67 : 284. 1957.

83- LEONARD L. JURD. 1962, Spectral properties of flavonoid compounds; in Geissman The Chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press. Oxford. P. 107. 1962.

84- KAJIMOTO Y. & et al. 1961, "Pharmacological studies on components derived from P. orientale var. pilosum". Shikoku Acta Med. (Jap) 17 (3) 7-14. 1961. Biol. Abst. 3557. Jan. 1962.

85- KARSTENS W.K.H. 1939, Anthocyanin and anthocyanin formation in seedlings of Fagopyrum esculentum. Rec. Trav. Bot. Neerl. 36 : 85-179. 1939.

86- KING H.G.C. 1962, J. Sci. Fd. Agric. 27 : 446. 1962.

87- KNAPP R. 1962, Eigenschaften und wirkungen der gibberelline. Springer - Verlag. Berlin. 1962.

88- KNYPL J.S. & DMITRUK A.P. 1961, Coumarin as the stimulator of growth of etiolated maize stem tissue. Curr. Sci. 30 : 12. 448-449. 1961.

89- KOEPPEN B.H. 1962, Flavone C-glycosides : The periodic acid oxidation of Orientin and Homo-Orientin tetramethyl ethers. Chem. & Ind. P. 2145. Dec. 29. 1962.

89 bis- - 1964, Structure of the glycosyl residues in Orientin and Homo-Orientin. South African Journal of Medicine. P. 154. Fde 1964.

90- U. KRANEN FIEDLER. 1955, Arzneimittel - Forsch. 5 : 609. 1955.

91- KUILMAN L.W. 1930, Physiologische Untersuchangen über die Anthocyane. Rec. Trav. Bot. Reerl. 27 : 287-416. 1930.

92- KURSAWA E. 1926, Experimental studies on the secretion of Fusarium heterosporum on rice plants. Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa. 16, 213-227. 1926.

93- LANG W. & K. SCHWANDT, 1957, "Glycosidal constituents of Camomille" Deut. Apotti. Ztg. 97, 149-1951. (Chem. Abst. 3860 D. 1960). 1957.

94- LEDERER E. 1960, "Chromatographie en chimie organique et biologique". Masson Edit. 2 Vol. 1548 Pages. 1960.

95- LEOPOLD A.C. 1963, Kinins and the Regulation of Leaf senescence. Régulateurs naturels de la croissance végétale. Coll. Intern. C.N.R.S. Publ. 1964. P. 705. 1963.

96- LEWIS Y.S. & NEELAKANTAN S. 1964, The real nature of tamarind axthoxanthins. (Tamarindus indica). Curr. Sci. 33 : 15. 460. 1964. 26-12-2110. Bull. Sig. 2. 1965.

97- LIBBERT E. & LUBKE H. 1960, Flora (Jena) 149-95. 1960.

98- - 1960, Flora (Jena) 149.77. 1960.

99- LIBBERT E. 1963, Significance and mechanism of action of natural Inhibitors. Régulateurs naturels de la croissance végétale. Coll. Intern. C.N.R.S. 1963. Publ. 1964. P. 387.

100- LINSKENS H.F. 1959, "Phenolische Verbindungen und Gerbstoffe". in LINSKENS "Papier Chromatographie in der Botanik. P. 330-337. Springer Verlag. Berlin - 1959.

101- LONA F. 1956, L'azione dell'acido gibberellico sull'accrescimento caulinare di talune piante erbacee in condizioni esterne controllate. Nuov. Giorn. Bot. ital. 63, 1, pp. 61-76. 1956.

102- LONA F, BOCCHI A, BORGHI R. et PERI A. 1956, Portamento rampicante volubile provocato in alcune piante, dal trattamento con acido gibberellico. Nuov. Giorn. Bot. ital. 63, 4, pp. 496-506. 1956.

103- LONA F. & BOCCHI A. 1957, Effetti morfogenetici ed organogenetici provocati dalla cinetina (Kinetin) su piante erbacee en condizioni esterne controllate. Nuovo G. Bot. Ital. 64 N° 1-2. 236-246. 1957.

104- [illegible] Action de l'acide gibbérellique sur Trifolium repens L. : observations sur quelques modifications morphologiques, physiologiques et anatomiques. Ann. Sci. Univ. Besançon, Bot. (1963), 2, n° 19, 43-53, fig. graph.

105- MAYER A.M, EVENARI M. 1952, The relation between the structure of coumarin and its derivatives and the activity as germinating inhibitors. Jour. Expt. Bot. 3. 246-252. 1952.

106- MAYER W. 1955, "Pflanzengerbstoffe" in Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 10. 354-388. Springer. Verlag. Berlin. 1955.

107- MEYERS (Mrs) M. & et al. 1959, "Some trace constituents of black tea". Chem. & Ind. 950-951. 1959.

108- MICHALUK A. 1962, "Identification of flavones in the baskets of Achillea millefolium". Dissertation Pharm. 140. 347-53. 1962. (Chem. Abst. 13712 C. 1963).

109- MELIN D. 1963, Evolution des flavonoides lors du vieillissement dans Periploca graeca. I. Rameaux volubiles. Etude par chromatographie sur papier. Ann. Sci. Univ. Besançon. 2° sér. Bota, fasc. 19, pp. 55-60. 1963.

110- - 1963, Sur la présence probable dans Periploca graeca de dérivés d'acides cinnamiques. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2° sér. Bota. fasc. 19, pp. 61-65. 1963.

111- MILLER C.O. 1956, Similarity of some Kinetin and red light effects. Plant Physiology. 31 : 4 - 318. 1956.

112- - 1961, Kinetin and related compounds in Plant Growth. Annual Review of Plant Physiology. Vol. 12. P. 395-406. 1961.

113- MILLET B. TAVANT H, PERNEY J.P, MANGE M. 1962. Etude des pigments chlorophylliens chez Vicia faba : action de l'acide gibbérellique. C.R. Acad. Sci. 255, n° 20, 2650-2, fig, tabl. 24-17-2738 Bull. signal., n° 4. 1963.

114- MOTHES K. 1963, The role of Kinetin in Plant Regulation. Régulateurs naturels de la croissance végétale. Coll. Intern. C.N.R.S. 1963. Publ. 1964. P. 131.

115- NAGAI I. 1921, "A genetico-physiological study on the formation of anthocyanin and brown pigments in plants". Journ. Coll. Agri. (Japan) 8.1.1921.

116- NICKE E. 1956, Contributions to the physiology of the tannins and flavone pigments in P. bistorta. Pharmazie 8 (11) 940-950. 1953 pub. 1956. Biol. Abst. 29504. 1957.

117- NOELL G. 1955, "Investigations on the effects of various factors on the flavonol content of Fagopyrum esculentum and F. tataricum". Pharmazie 10 (10) 609-615, 679-691. 1955.

118- OKUMURA F.S, Von SALTZA M.H, STRONG F.M., MILLER C.O. & SKOOG F. 1955, 28 th Meeting Amer Chem. Soc. Minneapolis. Minn. 1955.

119- OSBORNE D.J. 1962, Effect of Kinetin on protein and Nucleic acid metabolism in Xanthium leaves during senescence. Plant Physio. 37. 596-602. 1962.

120- PARIS R. 1952, "Chromatographie sur papier de quelques dérivés flavoniques". Bul. Soc. Chim. Biol. 34. 767-772. 1952.

121- - 1963, The distribution of plant glycosides. in Chemical Plant Taxonomy. Edit. T. Swain. P. 337. Acad. Press. London. 1963.

122- PERKIN A.G. 1898, J. Chem. Soc. 73. 1019. 1898.

123- POLITIS J. 1948, Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans les familles des Solanacées et dans les organes de ces plantes. C.R. Acad. Sci. 226 (8). 692-693. 1948.

124- - 1949, Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans les familles des Composées et dans les organes de ces plantes. C.R. Acad. Sci. 228 (3). 265-266. 1949.

125- POLLOCK B.M, R.H. GOODWIN & S. GREENE. 1954. Studies on Roots - Effects of coumarin, scopoletin and other substances on Growth. Amer. Jour. Bot. 41. 521-529. 1954.

126- POWELL R.D. & M.M. GRIFFITH. 1960, Some anatomical effects of Kinetin and red light on disks of Bean leaves. Plant Physiology. 35 : 2 - 273. 1960.

127- PRIDHAM J.B. 1963, Paper electrophoresis of phenolic compounds. in Methods in Polyphenol Chemistry. Pergamon Press. P. 111-125. 1963.

128- RABOT J. 1965, Etude par chromatographie des flavonoides des vrilles de Passifloracées. Dipl. Et. Sup. Besançon, Avril 1965.

129- REIO L. 1964, Second Supplement for the paper chromatographic separation and identification of phenol derivatives and related compounds of biochemical interest, using a "reference system". J. Chromatogr. Nederl. 13 : 2. 475-496. 1964.

130- REZNIK H. & EGGER K. 1961, "Benedicts Reagens als Indicator für phenolische ortho. Dihydroxgruppen". Zeischrift für analytische Chemie. 183 Band. 3. Heft. 1961. 196, pp. 196-199.

131- RIBEREAU GAYON P. 1964, Composés phénoliques du raisin et du vin. II - Les favonosides et les anthocyanosides. Ann. Phys. Veg. 6, 3. P. 211-243. 1964.

132- ROBERTS E.A.H. 1956, The Chlorogenic acids of tea and mate". Chem. & Ind. (London) 985. 13 July 1956.

133- ROBERTS E.A.H. & et al. 1956, "The leuco-anthocyanins of unprocessed tea leaf". J. Sci. Food & Agri. 7, P. 637. 1956.

134- - 1958, Paper chromatography as an aid to the taxonomy of Thea camellias. New Phytolo. 57, 211-215. 1958.

135- ROBERTS R.A. & et el. 1956, "The flavonols of tea". J. Sci. Food & Agri. 7, 253. 1956.

136- ROUX D.G. & MAIB A.E. 1960, "Selective spray reagents for the identification and estimation of flavonoid compounds with condensed tannins". J. Chromatogra. Nederlands 4, 1, 65-74. 1960.

137- SARGENT J.A. & SKOOG F. 1960, Effects of Indoleacetic acid and Kinetin on Scopoletin-Scopolin levels in relation to growth of tobacco tissues in Vitro. Plant Phy. 35. P. 934. 1960.

138- John A. SARGENT & F. SKOOG. 1961, "Scopoletin Glycosides in Tobacco tissue". Physiologia Plantarum Vol. 14. P. 504-519. 1961.

139- SCHUNK E. 1860, "On a yellow colouring matter obtained from the leaves of P. fagopyrum or common Buckwheat". Mem. Proc. Manchester Lit. & Phil. Soc. Séries 2. 15 : 122-129.

140- SCHUTTE H.R., BOHME H. 1958, "Chinasaüre als p. Cuma-rsaüre und Kaffeesaüre - Ester in Antirrhinum majus. Qual. Plantarum Material veg. Pays Bas. 1958. 3-4. 474-480. (20 - 235814 Bull. Sign. 1959 - N° 6).

141- SCOTT R.A, JR. & J.L. LIVERMAN. 1956, Promotion of leaf expansion by Kinetin and Benzylaminopurine. Plant Physiology. 31 : 4 - 321. 1956.

142- SECHET J., MASQUELIER J, TAYEAU F. 1959, Recherches sur les pigments de la graine de Tournesol (Helianthus annus L.). Bull. Soc. Chim. Biol. Fr. 41 : 7-8. 1059-1065. 1959.

143- SIEKEL M.K. & T.A. GEISMAN. 1957, Arch. Biochem. Biophys. 71 : 17. 1957.

144- SIEKEL M.K, A.J. BUSHNEL & R. BERZGALIS. 1962, Arch. Biochem. Biophys. 99 : 451. 1962.

145- MARGARET , K. SIEKEL. 1962, Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds. The chemistry of flavonoid compounds. Edit. T.A. Geisman. Pergamon Press Oxford. P. 34. 1962.

146- SIGMUND W. 1914, Uber die Ein Wirkung von Stoffwechselproducten auf die Pflanzen. Biochem. Zeit. 62. 229-386. 1914.

147- SKOOG F. & C.O. MILLER. 1957, Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues cultured in Vitro. The Biological Action of Growth Substances. Symp. of the Soc. for Exp. Biol. N° 11. P. 118-132. Cambridge University Press. England. 1957.

148- SKOOG F, & E. MONTALDI. 1961, Auxin-Kinetin interaction regulating the scopoletin and scopolin levels in tobacco tissue cultures. Proc. Nat. Acad. Sc. Wash. 47 : 36. 1961.

149- Ivor SMITH. 1960, Chromatographic and Electrophoretic techniques. Vol. 1 Chromatography. William HEINEMANN Medicals Books L.td. LONDON. Chapt. 16-17. 1960.

150- SRIVASTAVA S. & G. WARE. 1965, The effect of Kinetin on Nucleic acids and Nucleases of excised Barley leaves. Plant Physiol. 40 : 1. 62-64. 1965.

151- STOLL A. & E. JUCKER. 1958, "Heteroside, Aufbau und Vorkommen". Handbuch der Pflanzenphysiologie". VI - P. 534-777. Springer Verlag. Berlin. 1958.

152- STRONG F.M. 1956, Topics in microbial chemistry. John Wiley & Sons Inc. New York. 1958.

153- STUART N.W. and H.M. CATHEY. 1961, Applied aspects of gibberellins. Ann. Rev. Plant Physiology. P. 369. 1961.

154- SWAIN T. 1953, "The identifications of coumarins and related compounds by filter paper chromatography". Biochem. Jour. 53 200-208. 1953.

155- - 1963, "Chemical Plant Taxonomy". Academic Press London. 1963.

156- TAVANT H. 1960, Etude de la croissance et du développement de Begonia gracilis en conditions uniformes de lumière et de température, action de l'acide gibberellique. C.R. Acad. Sci. Paris, 251, pp. 1815-1817. 1960.

157- THIMANN K.V. & BONNER W.D. 1949, Inhibition of plant Growth by protoanemonin and coumarin and its prevention by BAL. Proc. Nat. Acad. Scien. 35. 272-276. 1949.

158- THOMPSON J.F. & et alii. 1959, Bot. Rev. 25. 1. 1959.

159- TOMASZEWSKI M. 1963, The mechanism of synergistic effect between Auxin and some natural Phenolic substances. Régulateurs naturels de la croissance végétale. Coll. Intern. C.N.R.S. 1963. Publ. 1964. P. 335.

160- TRONCHET A. 1955, Les Phytotrons. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème Sér. Bot. 6, pp. 3-18. 1955.

161- - 1957, La stimulation de la croissance des plantes par les gibberellines comparaison avec l'action des auxines, intervention d'un facteur du type gibberellique dans le cas de plantes volubiles. Bull. Soc. Hist. Doubs, 61, pp. 67-80. 1957.

162- - 1960, L'acide gibberellique et la circumnutation provoquée des tiges de Zinnia. Rev. hort, 2338, pp. 2319-2321. 1960.

163- TRONCHET A., MARCHAL J. 1960, Action de la gibberelline sur la croissance et les mouvements de Lactuca saligna L. Bull. Soc. Hist. Nat. Doubs. 1953-60, n° 62, fasc. 4, pp. 99-100. 1960.

164- TRONCHET A., TRONCHET Mme J, collab. PERNEY J.P. 1960, Modifications de croissance et mouvements révolutifs de plants de Zinnia traités par l'acide gibbérellique. In : "85ème Congrès des Soc. Savantes, Chambéry - Annecy 1960. Sect. Sci". Paris, Gauthier-Villard & Cie, 1961. 25 x 16, 5, 419-25, fig. graph. 24-17-592 Bull. signal. n° 1, 1963.

165- TRONCHET A, Mme J. TRONCHET, J.P. PERNEY. 1960, Sur les mouvements révolutifs de la tige de Zinnia elegans induits par l'acide gibbérellique. C.R. Acad. Sci. Paris. 250, pp. 576-578, Janvier 1960.

166- - 1960, Modification de croissance de Zinnia elegans après traitement par l'acide gibbérellique. C.R. Acad. Sci. 250, n° 7, 1328-30, fig. 21-255797 Bull. signal, 1960, 7-8.

167- TRONCHET A., Mme J. TRONCHET, J-M. BRESSOT, G. MARCHAND, B. BLANC. 1961, Sur les mouvements révolutifs de tiges traitées par l'acide gibbérellique. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème Sér. Bot. fasc. 17, pp.

168- TRONCHET A, MARCHAL J. 1961, Modifications anatomiques et physiologiques induites sur des plants de Lactuca saligna par traitement gibbérellique. 86ème Congrès nation. Soc. Sav. Montpellier. Mars 1961.

169- TRONCHET A, Mme J. TRONCHET, MARCHAL J. 1961, Transformation de feuilles en vrilles par traitement gibbérellique (Lactuca saligna L., var. annauelle). C.R. Acad. Sci., 252, n° 19, 2927-9, fig. graph. 22-17-5222 Bull. signal. n° 10. 1961.

170- TRONCHET A, Mme J. TRONCHET, PUTOT J.P. 1962, Action de l'acide gibbérellique sur Rubia tinctorum L. Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, 64, n° 1, 17-8. 23-17-6188 Bull. signal., n° 11-12. 1962.

171- TRONCHET A. 1962, Les kinines. Bull. Soc. Hist. Nat. Doubs, n° 64, fasc. 3-4, pp. 57-63. 1962.

172- TRONCHET A, Mme J. TRONCHET, C. ROUSSEL. 1963, Influence du traitement gibbérellique sur la morphologie, la structure anatomique, la croissance et les mouvements de Taraxacum officinale Weber. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème Sér. fasc. 19. pp. 3-20. 1963.

173- TRONCHET A, Mme J. TRONCHET et B. VUILLEMIN. 1964, Effets morphologiques d'un traitement à l'acide gibbérellique sur Polygonum aviculare. Ann. Sci. Univ. Besançon 2ème Série, Bot., fasc. 20 10 p. 1964.

174- TRONCHET Mme J. 1959-1960, Contribution à l'étude par chromatographie sur papier des flavonoides de Passiflora coerulea (vrilles stimulées et non stimulées, tiges). Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, 62, n° 2, 45-8, fig. 22-17-419 Bull. signal., n° 1. 1961.

175- - 1959-1960, Formation des pigments anthocyaniques dans les organes ou régions non volubiles des plantes grimpantes. Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, n° 62, 65-6, 1959-1960. 22-17-3869 Bull. signal., n° 7-8, 1961.

176- - 1959-1960, Etude par chromatographie sur papier des flavonoides de Convolvulus sepium, dans les flagelles volubiles, les tiges rampantes et les tiges rampantes devenues volubiles par traitement gibbérellique. Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, n° 62, fasc. 4, pp. 101-104. 1959-1960.

177- TRONCHET Mme J. 1960, Action de l'acide gibbérellique sur des tiges rampantes de Convolvulus sepium. Volubilisme et modifications du contenu biochimique. Etude par chromatographie sur papier. Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 6, n° 3, 168-9, tabl. 23-17-996 Bull. signal., n° 3. 1962.

178- - 1960, Tumorisation des plantules de Cuscuta gronovii Wild par la colchicine et un inhibiteur tégumentaire de germination et de croissance. Nécessité d'un "conditionnement". C.R. Acad. Sci. Paris, 250, pp. 1546-1548. 1960.

179- - 1960, Etude par chromatographie sur papier des modifications biochimiques réversibles induites par la stimulation de contact dans des vrilles d'Echinocystis wrightii. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème série, fasc. 15, pp. 75-80. 1960.

180- - 1960, Réactions des plantules normales et "conditionnées" de Cuscuta gronovii à la colchicine. Inhibition et formation d' intumescences. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème série, Bot. fasc. 15, pp. 81-93. 1960.

181- - 1960, Etude par chromatographie sur papier de modifications biochimiques réversibles liées aux réactions thigmotropiques des vrilles d'Echinocystis wrightii. Soc. fr. Physiol. Vég., 26 Mars 1960.

182- - 1960, Sur la présence d'hétérosides des flavonols kaempferol et quercétine dans des vrilles et tiges volubiles. Etude par chromatographie sur papier. Soc. fr. Physiol. Vég., Toulouse, 21 Mai 1960. 6, n° 2, p. 99.

183- - 1960, Modifications biochimiques liées aux réactions thigmotropiques. Etude par chromatographie sur papier. 85ème Congrès Nation. Soc. Sav., Chambery-Aix les Bains 8-12 Avril. p. 427-429. 1960.

184- - 1961, Sur la présence de flavonoides dans les tissus corticaux des vrilles et des tiges volubiles et leur intervention possible dans la circumnutation. 86ème Congrès des Soc. Sav., Montpellier, pp. 493-495. 1961.

185- - 1961, Etude par chromatographie sur papier d'une substance inhibitrice présente dans les tiges rampantes de Convolvulus sepium. Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, 63, n° 1, 11-3, tabl. 22-17-5223 Bull. signal., n° 10, 1961.

186- - 1961, Etude par chromatographie sur papier des flavonoides d' espèces "réfractaires" à un traitement gibbérellique. Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, n° 63, fasc. 2, 39-43. 23-12-1452 Bull. signal., n° 2, 1962.

187- - 1961, Effets d'un traitement gibbérellique sur des rameaux "juvéniles" de Hedera helix : chromatographie des flavonoides. Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, 63, n° 3, 57-64. 23-17-2580 Bull. signal., n° 5. 1962.

188- - 1961, Quelques remarques sur le contenu en flavonoides de plantes "réfractaires" à un traitement gibbérellique. Colloque Soc. Physiol. Vég. Clermont Ferrand. 27 Mai 1961.

189- TRONCHET Mme J. 1959, publié 1961, Contribution à l'étude de la croissance et des mouvements de la plantule de Cuscuta gronovii Willd. Ann. Sci. Univ. Besançon, Bot. 16, 206 p., fig., graph. tabl., bibl. (27 p). 23-17-4759 Bull. signal., n° 9, 1962.

190- - 1961, Comparaison par chromatographie sur papier des flavonoides de plants témoins et gibbérellinés (Mercurialis annua et Lactuca saligna). Ann. Sci. Univ. Besançon. Bot. 2, n° 17, 83-8, fig., bibl. (31 réf.). 24-17-421 Bull. signal., n° 1, 1963.

191- - 1962, Comparaison par chromatographie sur papier du contenu en flavonoides de tiges libres et de spires haustoriales de Cuscuta japonica. Ann. Scient. Univ. Besançon, 2ème série, Bot. 18, 101-107. 1962.

192- TRONCHET Mme J., MELIN D. 1962, Comparaison par chromatographie sur papier des flavoncides de flagelles de plantes volubiles (Convolvulus sepium et Periploca graeca). Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, n° 64, fasc. 2, 41-7, fig., bibl. (40 réf.). 24-17-1295 Bull. signal., n° 2. 1963.

193- TRONCHET Mme J. 1962, Effets physiologiques de la coumarine sur les plantules de Cuscuta. Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, n° 54, 65-7. 24-17-6056 Bull. signal., n° 10. 1963.

194- TRONCHET Mme J., G. BAS. 1963, Sur la présence d'un dérivé d'acide gentisique dans les tiges âgées de Humulus lupulus. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème sér. Bot., fasc. 19, pp. 21-24. 1963.

195- - 1963, Les flavonoides des tiges volubiles de Humulus lupulus. Formation d'un dérivé d'esculétine dans les portions enroulées. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème série, Bot. fasc. 19, pp. 25-33. 1963.

196- TRONCHET Mme J. 1964, Mise en évidence d'une dorsiventralité biochimique des rameaux juvéniles de Hedera helix (Etude par chromatographie sur papier). C.R. Acad. Sci. Fr. (1964), 258, n° 8, 2390-2, fig., tabl.

197- TRONCHET Mme J. et B. VUILLEMIN. 1964, Les flavonoides de Polygonum aviculare L. Effet du vieillissement et d'un traitement gibbérellique. Ann. Sci. Univ. Besançon, 2ème série, Bot. fasc. 20, 10 p. 1964.

198- TRONCHET Mme J. 1964, Sur la présence d'acide galloyl-quinique dans les tiges de Polygonum baldschuanicum Regel. Bull. Soc. Hist. Nat. Doubs. n° 66, fasc. 4. p. 3.1964.

199- - Communications personnelles.

200- TROYER J.R. 1955, The distribution of Rutin and other flavonoid substances in buckwheat seedlings. Plant Physi. Vol. 30. n° 2. p. 168-174. 1955.

201- TROYER J.R. 1956, Quantitative determination of buckwheat substances by absorptiometry of paper chromatograms. Plant. Phys. Vol. 31. N° 1. P. 71-75. 1956.

202- - 1956, Quantitative changes in buckwheat flavonoid substances during seedling development. Plant Phys. Vol. 31. N° 1. P. 75-79. 1956.

203- - 1958, Anthocyanin pigments of buckwheat hypocotyles. Ohio. J. Sci. 58 : 181-188. 1958.

204- - 1961, Occurence of a leucoanthocyanin in hypocotyles of etiolated buckwheat seedlings. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 77 : 137-140. 1961.

205- - 1964, Anthocyanin formation in excised segments of buckwheat seedling hypocotyles. Plant Physiol. 39 : 6. 907-912. 1964.

206- THIHAK E. & et alii. 1962, "Phytochemical investigations of apigenin glycosides of Matricaria chamomilla". Pharmazie 17 - 301-4 - 1962. Chem. Abst. 9954 d. 1962.

207- UNDERHILL E.W., J.E. WATKIN & A.C. NEISCH. 1957, "Biosynthesis of quercetin in buckwheat" Canad. Jour. Bioch. & physiol. 35 (3). 219-228 Illust. 1957. Biolog. Abst. 29594 - 1957. Part. 11 also. 35 (3) 229-237 - 1957. Biolog. Abst. 29595. 1957.

208- URBAN R.J. 1959, "Physiologische Untersuchungen über einige Flavonoide und Oxyzimtsäuren. II Untersuchungen über den Jahreszeitlichen und Tagesperiodischen Verlauf der Stoff. bildung". Planta 52. N° 5. 565-82. 1959.

209- VALENTINE J., G. WAGNER. 1953, "Die Flavonole und Gerbstoffe von Polygonum hydropiper". Pharm. Zentralhalle 92-354. 1953.

210- VELDSTRA H., E. HAVINGA. 1943, Uber struktur und wirkungs mechanismus der pflanzlichen Wuchs-und Hemmstoffe. Rec. Trav. Chim. Pays Bas. 62. 841-852. 1943.

211- WAGNER H. 1963, Infra red spectroscopy of flavonoids. Methods in Polyphenol Chemistry. P. 37-49. Pergamon Press. 1963.

212- WATKIN J.E. & et A.C. NEISH. 1960, "Biosynthesis of Quercetin in Buckwheat - III." Cand. Journ. of Biochem. & Physiol. 38 (6) 559-567 - 1960. Biol. Abst. 60676. 1960.

213- - 1962, "Biosynthesis of L-Rhamnose from D-glucose in Buckwheat". (F. tataricum). Phytochemistry 1, 52-57 (1961). Chem. Abst. 3827 h - 1962.

214- WILLIAMS A.H. 1955, "Paper chromatography of cinnamic acid derivatives". Chem. & Ind. p. 120. 1 jan. 1955.

215- WUNDERLICH A. 1908, "Uber das Fagopyrum-Rutin". Arch. Pharm. 246 . 241-256.

N° d'ordre : 16

VU et APPROUVE

Besançon, le 20 septembre 1965

LE DOYEN DE LA FACULTE DES SCIENCES

Signé : R.JACQUEMAIN

VU et PERMIS D'IMPRIMER

Besançon, le 27 Septembre 1965

LE RECTEUR DE L'ACADEMIE

signé : H.GAUTHIER